Nachweismethoden und klinische Bedeutung des Rheumafaktors

Mohamed Moussa

1962

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

Nachweismethoden und klinische Bedeutung des Rheumafaktors

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Mohamed Moussa
aus Port-Said / Ägypten

München 1962

A. Schubert, München 5, Corneliusstr. 21 · Telefon 221777

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. A. Herrmann

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.1962

Inhaltsverzeichnis

Der Rheumafaktor 5
Historische Entwicklung 5
Das makromolekulare Gammaglobulin im normalen Serum 7
Die 22 S-Komponente in Rheumaseren 8
Dissoziation der 22 S-Komponente 9
Isolierung und Charakterisierung des Rheumafaktors 9
Reaktion des Rheumafaktors mit Gammaglobulin 11
Die Reaktion des Rheumafaktors mit Antigen-Antikörper-Komplexen 13
Antikörper oder Komplement 14
Serologische Teste zum Nachweis der primär-chronischen Polyarthritis 16
Die Hämagglutinationsreaktionen 23
1. Waaler-Rose-Test (DAT) 28
2. Heller-Svartz-Schlossmann-Reaktion 29
3. Die Heller'sche Reaktion (SEA-Test) 29
4. Hämagglutinationstest mit menschlichen Erythrozyten Orh 31
5. Kälteglobulintest nach Svartz-Schlossmann 32
6. Euglobulintest 32
7. F-II-Test 33
Bewertung der Hämagglutinationstiter 33
Der Inhibitionstest 33
Methodik 36
Nachweis des Rheumafaktors mittels Streulichtmessung der Grenzschicht zwischen Patiertenserum und Gammaglobulin ... 41
Methodik 42
Untersuchungsergebnisse 46
Bentonit-Flockungstest (B.F.T.) 52
Der Latex-Fixationstest 54
Methodik 55
Der Latex-Tropfentest (Rheumatoid-Arthritis-Test) 59
Methodik 59

Inhaltsverzeichnis (Fortsetzung):

Die Streptokokken-Agglutinationen 62
Die L-Agglutination 63
Die O-Agglutination 64
Technik beider Reaktionen 66
a) Die L-Agglutination 66
b) Die O-Agglutination 67
Die Agglutinationsnormaltiter 67
Gibt es verschiedene Rheumafaktoren 70
Literaturverzeichnis 78

Der Rheumafaktor

Historische Entwicklung [1]

1930 beobachteten C e c i l u.a. [2], daß das Serum von Patienten mit primär-chronischer Polyarthritis hämolytische Streptokokken der Gruppe A agglutiniert. Die Beobachtung veranlaßte die Autoren, den Streptokokken eine ursächliche Rolle im Krankheitsgeschehen des primär-chronischen Rheumatismus zuzuschreiben. Diese Hypothese wurde hinfällig, als bekannt wurde, daß auch andere Bakterien durch Rheumaseren agglutiniert werden. Das Agglutinationsphänomen konnte danach nicht auf die Anwesenheit spezifischer Antikörper zurückgeführt werden. Als seine Ursache wurde ein hypothetischer, komplementähnlicher Faktor angenommen.

1940 berichtete W a a l e r [3] über einen Agglutinationstest, in dem Hammelblutkörperchen nach Sensibilisierung mit spezifischen Kaninchen-Antikörper von Rheumaseren agglutiniert werden. Die klinische Anwendung des Tests erbrachte das Ergebnis einer guten Korrelation zwischen positivem Hämagglutinationstest und dem klinischen Befund, der bei primär-chronischer Polyarthritis erhoben wird. Damit wurde die Frage nach der Natur des Serumfaktors und nach der Art der Substanz, mit der er reagiert, aufgeworfen.

In der Folgezeit sind mehrere Modifikationen des Hämagglutinationstests entwickelt worden, die über die Substanz Aufschluß gaben, die die Agglutinationssysteme für den Rheumafaktor empfindlich macht. Es erwies sich, daß neben Hammelerythrocyten auch solche anderer, verwandter Tiere geeignet sind und daß auch des Patienten eigene Erythrocyten erfolgreich verwendet werden können, wenn sie mit spezifischem Kaninchen-Antikörper vorher sensibilisiert werden. In einer anderen Modifikation, in der menschliche Rh (+) - Erythrocyten der Blutgruppe 0 benutzt werden, wird die Sensibilisierung nicht durch Kaninchen-Antikörper, sondern durch menschliche Rh-Antikörper erreicht [4]. In einer noch anderen Abwandlung wird der Antikörper durch Gammaglobulin

der Cohn-Fraktion II ersetzt, das unspezifisch an die Oberfläche von Erythrocyten adsorbiert wird, die vorher mit Tannin behandelt worden sind. Schließlich können an Stelle der Erythrocyten auch partikuläre Substanzen völlig anderer Natur verwendet werden, nämlich künstliche Polymere wie Latex [5] und natürlich vorkommende Kolloide.

Diese Agglutinationssysteme unterscheiden sich durch die Art der verwendeten Partikel. Sie haben aber alle gemein, Gammaglobulin in irgendeiner Form zu enthalten. Es ist spezifisch oder unspezifisch an die Oberfläche der Partikel adsorbiert und ist offensichtlich der kritische Bestandteil, während die Partikel als Träger eine sekundäre Rolle spielen. Dieses Konzept wurde wesentlich gestützt durch die wichtige Beobachtung, daß Gammaglobulin der Cohn-Fraktion II, ohne an einen Träger fixiert zu sein, eine Präcipitationsreaktion auslöst, wenn es mit Rheumaserum versetzt wird [6]. Warum einige Gammaglobulinpräparate weniger aktiv waren als andere, blieb unverständlich, bis erkannt wurde, daß nur solches Gammaglobulin den Rheumafaktor zur Präzipitation bringt, welches eine bestimmte Veränderung erfahren hat [7].

Die Frage nach der Natur des Rheumafaktors ist während der letzten Jahre mit den für die Fraktionierung von Serumeiweiß entwickelten, modernen Methoden bearbeitet worden. Nach Fraktionierung von Rheumaserum mittels der Cohnschen Äthanolmethode war die agglutinierende Eigenschaft des Serums in der Fraktion III konzentriert [8], die Beta-Lipoprotein, Alpha- und Gammaglobulin enthält. Nach einfacher Veränderung des Serums mit Wasser wurde die serologische Aktivität in der wasserunlöslichen Euglobulinfraktion gefunden [9, 10]. Bei der Untersuchung von elektrophoretischen Serumfraktionen konnte die Aktivität ausschließlich im Bereich der Gammaglobuline nachgewiesen werden [9, 10]. Nun sind die Gammaglobuline eine komplexe Fraktion, denen Komponenten sich physikalisch und chemisch unterscheiden [16], und es blieb zu klären, welcher Unterfraktion der Rheumafaktor angehört, und ob der Faktor chemisch und physikalisch mit einem normalen Gammaglobulin vergleichbar ist oder ein pathologisches Protein darstellt. In diesem Zusammenhang ist eine Beobachtung interessant, der zufolge der Kohlenhydratgehalt der Gammaglobulinfraktion in Rheumaseren abnorm hoch ist. Der abnorm hohe

Kohlenhydratgehalt bleibt wie die Agglutinationsaktivität des Serums unbeeinflußt durch Cortisonbehandlung, unter der das Serumproteinbild weitgehend normalisiert wird.

Eine weitgehende Klärung des Problems resultierte aus Untersuchungen, in denen präparative Zonenelektrophorese mit analytischer und präparativer Ultrazentrifugation kombiniert wurde. Auf diese Weise konnte der Faktor als Molekül hohen Molekulargewichts charakterisiert werden. Die sogenannte Zonenultrazentrifugation erwies sich als eine geeignete Methode für seine Isolierung [11, 12]. Eine andere Methode, mit der eine beträchtliche Anreicherung beziehungsweise Isolierung des Rheumafaktors erreicht wurde, ist die Chromatographie an der Zellulosesäule, wobei sowohl Anionenaustauscher- [13] als auch Kationenaustauscher-Zellulose mit gutem Erfolg verwendet worden sind. Eine Anreicherung des Faktors ist auch durch die Kombination der Äthanolfraktionierung mit der präparativen Ultrazentrifugation erzielt worden.

Das makromolekulare Gammaglobulin im normalen Serum

Die durch Elektrophorese von Serum gewonnene Gammaglobulinfraktion ist komplex. In der Ultrazentrifuge betrachtet, besteht sie aus einer schnell sedimentierenden und aus einer langsam sedimentierenden Komponente [14, 15]. Die schnelle Komponente hat ein Molekulargewicht von etwa einer Million und eine Sedimentationskonstante von 19 Svedberg-Einheiten (19-S-Gammaglobulin). Die langsame Komponente besitzt ein Molekulargewicht von 160 000 und eine Sedimentationskonstante von 7 Svedberg-Einheiten (7 S-Gammaglobulin). Der Anteil des schweren Gammaglobulins an der Gesamtfraktion beträgt 5-10% und am Normalserum 1-2%. Die beiden Gammaglobuline weisen chemische Unterschiede auf, die sich an ihrem Kohlenhydratgehalt demonstrieren lassen. Wie alle Serumglobuline enthalten sie Hexosen, Hexosamin und Sialinsäure, aber das 19 S-Gammaglobulin (19 Svedberg-Einheiten) besitzt viermal soviel Gesamt-Kohlenhydrat wie das 7 S-Gammaglobulin [16]. Dennoch sind die beiden Eiweißkörper chemisch nicht völlig verschieden, sondern verwandt, wie aus immunologischen Studien hervorgeht [17]. Die Moleküle des 19 S-Gammaglobulin sind aus Einheiten aufgebaut, die in ihrer Größe etwa dem leichten Gammaglobulin entsprechen und die durch S-S-Brücken miteinander verbunden

sind. Es ist in letzter Zeit an Hand mehrerer Beispiele demonstriert worden, daß das 19-S-Gammaglobulin Antikörper enthält [18, 19], was von dem 7-S-Gammaglobulin seit langem bekannt war.

Die 22 S-Komponente in Rheumaseren

Bei der ultrazentrifugalen Untersuchung der Gammaglobulinfraktion von Patienten mit primär-Polyarthritis, die stark positive Agglutinationsreaktionen hatten, wurde eine neue, im Normalserum nicht vorkommende Komponente beobachtet [7]. Diese Komponente sedimentiert schneller als das 7 S- und 19 S-Gammaglobulin, ist also noch schwerer als letzteres und hat eine Sedimentationskonstante von 22 S. Aus mehreren Beobachtungen folgte mit großer Gewißheit, daß die Agglutinations- und Präzipitationseigenschaften von Rheumaserum mit dieser "abnormalen" Komponente vergesellschaftet sind. Die Korrelation zwischen der Konzentration der 22 S-Komponente im Serum und dessen Agglutinationstiter war befriedigend. In Experimenten mit der Ultrazentrifuge, in denen die schweren von den leichten Gammaglobulinmolekülen durch einen Dichtegradienten getrennt werden konnten, sedimentierten die serologischen Aktivitäten ausschließlich zusammen mit den schweren Molekülen. Nach Ausführen des Präzipitationstests mit Cohn-Fraktion II, welcher einer der gebräuchlichsten serologischen Teste ist (s.o.), und nach Abzentrifugieren des Präzipitates, war die vorher ausgeprägte 22 S-Komponente im überstehenden Serum stark vermindert oder nicht mehr vorhanden [7, 20].

Die Konzentration der 22 S-Komponente in den untersuchten Seren variierte zwischen 0 und mehr als 300 mg pro 100 ml. Daß die Komponente nicht in allen Seren mit positiven Agglutinationsreaktionen beobachtet werden konnte, kann zwanglos mit der relativ geringen Empfindlichkeit der Ultrazentrifuge erklärt werden. Substanzen, die eine bestimmte Mindestkonzentration unterschreiten, können mit der Ultrazentrifuge nicht entdeckt werden, obgleich sie auf Grund ihrer biologischen Aktivität mit anderen Methoden unschwer nachweisbar sein mögen.

versuche, Aufschluß über die chemische Natur der 22 S-Komponente zu erhalten, ergaben, daß ihr Kohlenhydratgehalt größenordnungsmäßig zwischen dem des 7 S- und dem des 19 S-Gammaglobulin liegt [20].

Dissoziation der 22 S-Komponente

Die Frage, ob die 22 S-Komponente ein physikalisch und chemisch atypisches Protein darstelle oder möglicherweise einen Komplex aus den beiden typischen Gammaglobulinen, wurde durch folgende Beobachtungen beantwortet [21]: Wenn Gammaglobulin oder Euglobulin, die die 22 S-Komponente mit Sicherheit enthalten, mit 3- bis 6-molaren Harnstofflösungen oder mit Glykokollpuffer, pH 3, in Lösung gebracht werden, dann ist die 22 S-Komponente mit der Ultrazentrifuge nicht mehr nachzuweisen. Es werden nur die 7 S- und die 19 S-Fraktion gesehen. Verglichen aber mit ihrer ursprünglichen Konzentration, haben diese beiden Fraktionen mit dem Verschwinden der 22 S-Komponente meßbar zugenommen. Wenn in einem Experiment, in dem Harnstoff als Lösungsmittel verwendet wurde, der Harnstoff durch Dialyse gegen 5% Kochsalz-Lösung entfernt wird, tritt die 22 S-Komponente wieder in Erscheinung.

Die zwanglose Deutung dieser Experimente ist, daß die 22 S-Komponente einen reversibel dissoziierbaren Komplex aus 19 S- und 7 S-Gammaglobulin darstellt. Aus den Daten von elf Experimenten wurde eine durchschnittliche Komposition von 57% 7 S- und 3% 19 S-Komponente errechnet, was einem Verhältnis von einem schweren zu sechs leichten Gammaglobulinmolekülen entspricht [21].

Isolierung und Charakterisierung des Rheumafaktors

Den Beobachtungen über die Dissoziation der 22 S-Komponente ist zu entnehmen, daß der Rheumafaktor im Serum nicht in freier Form, sondern als löslicher Komplex mit Gammaglobulin auftritt. Für die Isolierung wurde deshalb Ausgangsmaterial benutzt, in dem der Rheumafaktor in dissoziierter Form enthalten ist. Euglobulinfraktionen oder Präzipitate des Faktors mit Gammaglobulin wurden in Glykokollpuffer pH 3 gelöst und der Zonenultrazentrifugation unterworfen [12]. Die Lösung des Ausgangsmaterials wird dabei in dem Zentrifugenröhrchen einer Rohrzuckerlösung überschichtet, deren Konzentration von oben nach unten zunimmt. Während der Zentrifugation trennen sich die Eiweiße in Abhängigkeit von ihren Sedimentationskonstanten als Zonen, die durch den Dichtegradienten stabilisiert werden. Nach erfolgter Trennung werden die Zonen durch

schichtweises Abpipettieren oder durch Auffangen der durch ein Loch im Boden des Zentrifugenröhrchens auftretenden Tropfen in einen Fraktionensammler gewonnen. Die so erhaltene 19 S-Fraktion war mehr als 90% rein und war äußerst aktiv in den verschiedenen serologischen Tests [11, 12].

Die Ähnlichkeit des Rheumafaktors mit dem 19 S-Gammaglobulin des Normalserums ist verblüffend. In der Tat haben sich bisher keine Abweichungen der untersuchten physikalischen und chemischen Eigenschaften finden lassen. Die Sedimentationskonstante der beiden Proteine in der Ultrazentrifuge sind praktisch identisch [11, 20]. Der Gehalt des Rheumafaktors an Hexosen, Hexosamin und Sialinsäure ist relativ hoch und derselbe wie der des 19 S-Gammaglobulins [12, 21]. Auch hinsichtlich ihrer immunologischen Eigenschaften gleichen sich die beiden Eiweißkörper, denn im Ouchterlony-Diffusionstest ergeben sie die Identitätsreaktion [12].

Der bisher einzige, aber entscheidende Unterschied besteht in der Aktivität des Rheumafaktors, also in seiner Fähigkeit, mit Gammaglobulin zu reagieren, welche dem normalen 19 S-Gammaglobulin fehlt. Daß der funktionelle Unterschied ein physikochemisches Korrelat haben muß, ist evident. Möglicherweise besteht er in einer verschiedenen molekularen Konfiguration. Durch Spaltung intramolekularer S-S-Brücken, welche zu einer Depolymerisation des Rheumafaktors zu 7 S-Einheiten führt, geht die serologische Aktivität verloren [11]. Sie ist also an eine intakte Struktur des Makromoleküls gebunden.

In letzter Zeit gelang es, den sogenannten Rheumafaktor näher zu definieren [22]. S v a r t z und Mitarbeiter lokalisierten ihn durch Zonenelektrophorese in der Gammaglobulinfraktion und erzielten durch Chromatographie eine beträchtliche Anreicherung. Z i f f und Mitarbeiter [23] präzipitierten Rheumatikerserum mit Ammoniumsulfat, dialysierten, präzipitierten in der Kälte und reinigten weiter durch Chromatographie. Sie fanden elektrophoretisch zwei Komponenten im Beta-Gamma-Bereich. B r a u n s t e i n e r und Mitarbeiter [22] konnten nach Fraktionierung des Serums durch zweidimensionale Elektrophorese eine Fraktion im Beta-Gamma-Bereich darstellen, die den Rheumafaktor in über 300facher

Konzentration enthält. Untersuchungen dieser angereicherten Fraktionen in der Ultrazentrifuge durch S v a r t z und Mitarbeiter [24], K u n k e l und Mitarbeiter [11] sowie B r a u n s t e i n e r und Mitarbeiter [22] ergeben übereinstimmend, daß es sich um ein Makroglobulin mit einer Sedimentationskonstanten von S 19 handelt, wobei sich im Nativserum Komplexe mit einer Sedimentationskonstanten von S 22, aufgebaut aus dem Makroglobulin mit S 19 und Globulinen mit S 7, finden können.

Der Rheumafaktor bleibt stabil in einem Bereich von pH 4 bis pH 11, bleibt bei 56 Grad C aktiv, wird bei 80 Grad C teilweise und bei 100 Grad C nach 30 Minuten inaktiviert. Trypsin und Papain sind ohne Wirkung, während er durch Sulfhydrilgruppen aufgebrochen wird. Er reagiert mit Gammaglobulin von etwa 60% der Bevölkerung besser als mit den restlichen 40% [40].

Reaktion des Rheumafaktors mit Gammaglobulin

Zwei verschiedene Reaktionsweisen des Rheumafaktors mit Gammaglobulin können unterschieden werden: die mit 7 S-Gammaglobulin im Rheumaserum und die mit löslichen Aggregaten des Gammaglobulins, die dem Rheumaserum zugesetzt werden.

Die erstere [26] führt zur Bildung der 22 S-Komponente, des löslichen Komplexes aus Rheumafaktor und 7 S-Gammaglobulin. Da, wie vorher angeführt, der Rheumafaktor nicht nur mit Kaninchen-Antikörper Verbindung eingeht, sondern auch mit menschlichem Antikörper und mit Anteilen der Cohn-Fraktion II, ist seine Reaktion im Serum mit dem dort anwesenden Gammaglobulin kaum überraschend. Die Reaktion führt nicht zur Präzipitation der Komponenten. Offenbar vermag das 7 S-Molekül jeweils nur eine Bindung einzugehen, weshalb es nicht zum fortschreitenden Anwachsen der Komplexe und zum Überschreiten der Löslichkeitsgrenze kommt.

Die Bindung zwischen Rheumafaktor und 7 S-Gammaglobulin ist locker und Reversibel, wie die Dissoziationsexperimente [21] gezeigt haben. Auch unter den im Serum vorherrschenden Bedingungen sind die gebundenen 7 S-Moleküle nicht irreversibel gebunden. Die gebundenen stehen mit den freien 7 S-Molekülen im Gleichgewicht. Der Austausch konnte mittels radioaktivem Gammaglobulin demonstriert werden [21].

Ob alle 7 S-Moleküle zur Bindung befähigt sind oder nur solche, die eine spezifische Änderung erfahren haben, ist unbekannt. Das Phänomen scheint nicht an Gammaglobulin von Rheumaseren gebunden zu sein. Es war möglich, mit 19 S-Rheumafaktor und 7 S-Gammaglobulin der Cohn-Fraktion II, also mit Gammaglobulin, das nicht Rheumaseren entstammt, Komplexe zu bilden, die der 22 S-Komponente ähnlich waren [21].

Die andere Form der Reaktion des Rheumafaktors mit Gammaglobulin führt zur Bildung eines Präzipitates. Sie wird beobachtet, wenn man bestimmte Präparationen der Cohn-Fraktion II mit Rheumaserum versetzt [6]. Nicht alle Gammaglobulinpräparate sind dazu geeignet. Elektrophoretisch isoliertes Gammaglobulin aus menschlichem Normalserum zum Beispiel ist völlig ungeeignet [7]. Präparate, die zunächst kein Präzipitat mit Rheumaserum erzeugen, können jedoch durch verschiedene Verfahren aktiv gemacht werden. Solche Verfahren sind Erhitzen einer Gammaglobulin-Lösung auf 65 Grad C für 5-15 Minuten oder Behandlung mit Harnstoff, Methylmerkaptan, Alkali oder Säure [7]. Dadurch bildet ein Teil des 7 S-Gammaglobulins größere, lösliche Aggregate. Wenn eine solche Gammaglobulin-Lösung kurzfristig ultrazentrifugiert wird und die Bodenfraktion und das Überstehende getrennt mit Rheumaserum getestet werden, erweist sich nur die Bodenfraktion, die die sehr schnell sedimentierenden Aggregate enthält, als aktiv. Nur die Aggregate verursachen mit Rheumaserum die Bildung eines Präzipitates [7].

Das Präzipitat ist völlig unlöslich in physiologischer Kochsalzlösung, löst sich aber prompt und vollständig in 3-6-molarer Harnstoff-Lösung und in Glykollpuffer pH 3 [20, 21]. Wenn das gelöste Präzipitat in der Ultrazentrifuge untersucht wird, fallen zwei distinkte Komponenten auf, die etwa in gleicher Konzentration vertreten sind. Die eine entspricht dem 7 S-, die andere dem 19 S-Gammaglobulin. Außerdem ist eine von Fall zu Fall variable Menge einer in breiter Verteilung sehr schnell sedimentierenden Komponente sichtbar, deren langsame Anteile eine Sedimentationskonstante von 35 S und deren schnelle Anteile eine solche von 150 S besitzen. Sie besteht aus Aggregaten verschiedener Größe, die ausschließlich dem Gammaglobulinpräparat entstammen, das zur Präzipitation verwendet wurde [21]. Die 19 S-Komponente ist serologisch hochaktiver

Rheumafaktor. Präzipitate sind deshalb auch als Ausgangsmaterial zur Isolierung von Rheumafaktor benutzt worden. Die 7 S-Komponente entstammt dem Rheumaserum und entspricht den im 22 S-Komplex gebundenen 7 S-Molekülen. Der 22 S-Komplex wird demnach als solcher durch die Aggregate präzipitiert [21].

Die Reaktion des Rheumafaktors mit Antigen-Antikörper-Komplexen

Es wurde einleitend dargelegt, daß der Rheumafaktor an einige bakterielle und zelluläre Immunsysteme adsorbiert werden kann. In dieser Hinsicht verhält sich der Faktor wie die Komplement-Komponenten des Normalserums, die mit Antigen-Antikörper-Komplexen Verbindung eingehen, für deren Entsteheung aber nicht erforderlich sind. Wenn Serum auf 56 Grad C erhitzt wird, verliert das Komplement die Fähigkeit, sich an Immunkomplexe anzulagern. V a u g h a n [25] hat das Verhalten des Rheumafaktors zu Immunsystemen am Beispiel von Antigen-Antikörperpräzipitaten untersucht. Während Antigen-Kaninchenantikörper-Präzipitate in starkem Maße Rheumafaktor adsorbierten, hatten Immunpräzipitate, die mit Antikörper vom Pferd oder vom Meerschweinchen gebildet waren, diese Eigenschaft nicht. Dabei ist hervorzuheben, daß das verwendete Antigen-Meerschweinchen-Antikörpersystem gleichwohl Komplement zu binden vermochte. Die Bindung von Rheumafaktor an die Kaninchen-Antikörper-Präzipitate wurde beobachtet nach Inaktivierung des Komplements im Rheumaserum durch Erhitzen.

Mit isoliertem, reinem Rheumafaktor (s. Seite 9) wurde das Verhalten zu löslichen Antigen-Antikörper-Komplexen untersucht [27]. Lösliche Antigen-Antikörper-Komplexe treten auf, wenn das Antigen im Exzeß vorhanden ist. Mit zunehmender Antigen-Konzentration wird daher die Menge des resultierenden Immunpräzipitates geringer. In Experimenten, in denen Rheumafaktor in geringen Mengen Antigen-Antikörpersysteme zugesetzt wurde, war die anfallende Präzipitatmenge bei Antigenexzeß um ein mehrfaches größer als bei Abwesenheit von Rheumafaktor. Es konnte gezeigt werden, daß lösliche Antigen-Antikörper-Komplexe durch Rheumafaktor präzipitiert werden, wenn deren Sedimentationskonstante größer ist als 20 S [27]. Erhitzen des Rheumafaktorpräparates auf 56 Grad C hatte eine nur geringe Verminderung der Aktivität zur Folge.

Antikörper oder Komplement

Nach der Diskussion des Rheumafaktors, seiner Charakteristika, seiner Reaktionen mit Gammaglobulin und der Häufigkeit seines Auftretens bei primär-chronischer Polyarthritis und einigen anderen Krankheiten ergibt sich die Frage nach seiner Bedeutung für das Krankheitsgeschehen. Spielt der Rheumafaktor eine Rolle bei der Entstehung der primär-chronischen Polyarthritis und der anderen Krankheiten, bei denen der Faktor vorkommt? Trägt er zur Unterhaltung bestimmter Krankheitssymptome bei? Oder ist er eine Folge des Krankheitsprozesses, die für die Krankheit selbst unbedeutend ist? Diese Fragen können gegenwärtig nicht beantwortet werden.

Die Klärung des Problems ist möglicherweise an die Beantwortung der konkreten Frage geknüpft, ob der Rheumafaktor ein Antikörper oder eine Komponente des Komplementes oder aber ein unspezifischer Eiweißkörper ist, der eine rein physikalisch-chemische, nicht aber immunologische Affinität zu Gammaglobulin besitzt. Auch hier gibt es noch keine eindeutige Antwort, aber Befunde, die die Diskussion ermöglichen. Zwar wird der Rheumafaktor wie Komplement an Immunpräzipitate [25] und lösliche Antigen-Antikörperkomplexe [27] gebunden, aber nicht ohne Abweichungen, denn bestimmte Immunpräzipitate binden zwar Komplement, nicht aber den Rheumafaktor [25]. Vor allem aber wird Komplement durch Erhitzen inaktiviert, während der Rheumafaktor thermostabil ist [25, 27]. Ein Vergleich mit den verschiedenen Komponenten des Komplements ergab, daß der Rheumafaktor mit keiner der bekannten Komponenten identisch ist. Dagegen haben physikalische, chemische und immunologische Untersuchungen [12, 21] gezeigt, daß der Rheumafaktor einer bekannten Antikörperfraktion gleicht, nämlich dem makromolekularen Gammaglobulin [16, 17]. Dieser Befund macht in der Tat wahrscheinlich, daß der Rheumafaktor ein spezifischer Antikörper ist. Seine Fähigkeit, mit Gammaglobulin als korrespondierender Antigen anzusehen.

Es ergibt sich dann die Frage, auf welche Weise Gammaglobulin für den Organismus, in dem es synthetisiert worden ist, Antigencharakter gewinnen kann. Nach einem experimentell fundierten Konzept [28] können Antigen-Antikörperkomplexe sich wie Antigene verhalten und selbst Anlaß zur Bildung von spezifischem Antikörper geben. Da ein

Teil eines solchen komplexen Antigens aus Gammaglobulin besteht, kann erwartet werden, daß der resultierende Antikörper zum Teil auch gegen Gammaglobulin gerichtet ist. Wenn das Konzept auf den Rheumafaktor ist, dann entspricht seine Reaktion mit Gammaglobulin der mit einem Teil des noch unbekannten, komplexen Antigens [28]. Solange ein solches Antigen noch nicht gefunden ist, könnten möglicherweise Tierexperimente dazu dienen, die Validität dieses Konzeptes zu prüfen. Tatsächlich scheinen Experimente mit Kaninchen erbracht zu haben, daß es möglich ist, durch Immunisierung mit bakteriellen Antigenen positive Hämagglutinationstiter zu erzeugen [30]. Aus einer großen Anzahl zur Immunisierung verwendeter Bakterienstämme haben sich einige, darunter auch Streptkokken [26], als geeignet erwiesen, den Agglutinationsfaktor zu induzieren. Dabei traten zunächst nur Bakterienantikörper auf und erst zu einem späteren Zeitpunkt wurde der Hämagglutinationstiter positiv. Wahrscheinlich ist der im Serum der Tiere auftretende Agglutinationsfaktor ein Antikörper, der gegen den Komplex aus dem bakteriellen Antigen und dem korrespondierenden Antikörper gerichtet ist. Ob für das Auftreten des Rheumafaktors beim Patienten ein ähnlicher Mechanismus gilt, bleibt zunächst offen.

Die pathogenetische Bedeutung sowie die eventuelle Antikörperstruktur des Rheumafaktors sind noch umstritten. Er gehört sicherlich nicht zum Komplement-Properdinsystem [29]. Am ehesten hat er noch Konglutinineigenschaften. Für die Tatsache, daß es sich um einen Autoantikörper handeln könnte, spricht, daß sich die meisten Autoantikörper physikalisch-chemisch ähnlich verhalten. Dies stellt natürlich keinen Beweis dar.

Schon 1954 versuchte S t e f f e n [31] spezifische Autoantikörper, die gegen körpereigenes Gewebe gerichtet sind, nachzuweisen. Das Wesen seiner Reaktion besteht darin, daß er Antikörper an lyophilisiertes Gewebssubstrat (Muskel oder Gelenkskapselsubstrat) absorbiert. Dieses Antigen-Antikörpersubstrat wird nun mit einem Antiglobulinserum inkubiert und die Anwesenheit von Antikörper durch die Titersenkung des genannten Cooms-Serums sichtbar gemacht. Die Methodik dieser Probe ist nicht einfach, sie verspricht jedoch zur Klärung der Antikörpernatur, des sogenannten Rheumafaktors, beizutragen.

Die ursächliche Bedeutung des Rheumafaktors bei der Entstehung der

Erkrankung kann heute als ziemlich sicher abgelehnt werden, da es ja Agammaglobulin gibt [29], die mit einer primär chronischen Polyarthritis gemeinsam vorkommen können. Es wäre jedoch möglich, daß er die Ursache sekundärer Veränderungen, wie z.B. Rheumaknötchen, sein könnte. Diese Ansicht wird besonders von Kunkel vertreten. Dagegen spricht, daß es Egghart, Wiedermann und Braunsteiner [32] bisher nie gelungen ist, den Faktor aus exzidierten Knötchen zu isolieren. Auch die Vermutung, daß es in den gelenksnahen Kapillaren zu einer Antigen-Antikörperreaktion kommt, ist unbewiesen. Egghart, Wiedermann und Braunsteiner [32] neigen auf Grund ihrer Untersuchungen und Erfahrungen eher dazu, daß der Faktor im Rahmen eines sekundären Geschehens entsteht und daß seine pathogene Bedeutung eher gering ist. Bedeutungsvoll ist jedoch sein Nachweis mittels der beschriebenen Reaktionen bei entsprechendem klinischen Verdacht, wobei ihm praktisch eine beweisende Rolle zukommt. Diagnostische Zweifel im Verein mit der Klinik sind nur bei gewissen Kollagenerkrankungen und auch da nur in den seltensten Fällen zu erwarten.

Serologische Teste zum Nachweis der primär-chronischen Polyarthritis

In der letzten Zeit wurden zahlreiche Methoden, Verbesserungen und Modifikationen entwickelt, die zur serologischen Diagnose der primär chronischen Polyarthritis dienen. Allen diesen Reaktionen gemeinsam ist der Nachweis eines für diese Erkrankung weitgehend spezifischen Serumfaktors.

Im Jahre 1922 fanden Meyer und Olsen [32, 33, 34] erstmal in menschlichen Seren hämagglutinationsfördernde Substanzen. Jedoch erst 1937 machte Waaler [3] die Beobachtung, daß es Seren von "Rheumatikern" sind, die in einem relativ hohen Prozentsatz die Agglutination von sensibilisierten Hammelblutkörperchen bewirken. Er fand diese Eigenschaft bei 27 von 77 untersuchten Rheumatikerseren und vermutete als Ursache einen spezifischen Faktor der Gammaglobulinreihe. Waaler hielt die diagnostische Bedeutung dieser Tatsache für bedeutungslos, da der Prozentsatz der positiven Resultate zu gering war. Auch die zusätzlich durchgeführte Differentialtiterbestimmung von Rose und Ragan [35] ergab keine wesentlich besseren Ergebnisse. Erst nach vorheriger

Absorption der zu prüfenden Seren mit nicht sensibilisierten Schafbluterythrozyten wurden die Resultate besser. Die mit den verschiedenen Techniken erzielten Resultate waren stark schwankend [36, 37], sie waren jedoch immerhin besser als die damals bekannten Streptokokkenagglutinationsreaktionen, die zum Nachweis der primär chronischen Polyarthritis versucht wurden [2]. Diese basierten auf der Tatsache, daß gewisse Streptokokkenstämme durch manche Rheumatikerseren agglutiniert werden. Ähnliches wurde auch bei Verwendung von Pneumokokken und Staphylokokken nachgewiesen [38].

Einen weiteren Fortschritt stellte die Beobachtung dar, daß der im Rheumatikerserum vermutete Faktor mit Gammaglobulin eine Bindung eingehen kann. Dieser Beobachtung liegt der F-II-Test von B o y d e n bzw. H e l l e r zugrunde [39, 8]. Mit Tannin vorbehandelte Schaferythrozyten werden mit der Cohn'schen Fraktion II beladen. Bei positivem Ausfall kommt es dann nach der Inkubation zur sichtbaren Agglutination der Schaferythrozyten.

Im Sinne der Weiterentwicklung und vereinfachung letzterer Methode wurde versucht, die Trägersubstanz durch andere Medien zu ersetzen. So verwendeten S i n g e r und P l o t z [5] 1956 eine Suspension von Latexpartikelchen mit einer Teilchengröße von 0,81 Mikromillimeter. Dieser Latexfixationstest zeigte sich wegen seiner Einfachheit und Genauigkeit den bisher bekannten Methoden überlegen. Er hat sich als Routinemethode für die Praxis bewährt. Als Trägerstoffe fanden noch zahlreiche andere Substanzen Verwendung. Z a v á z a l [41] benutzte Kollodium. Es ist dies die Weiterentwicklung der Cavelti'schen Kollodiumreaktion. Voraussetzung ist immer die gleiche Teilchengröße des vorliegenden Mediums.

Weitere Medofikationen trachteten nun die erzielten Resultate zu verbessern sowie den Test noch einfach, rascher und wirtschaftlicher zu gestalten. R h e i n s und Mitarbeiter [42] verwendeten bei ihrer Tropfenmethode Latexpartikelchen von einer Größe von 1,17 Mikromillimeter, wobei zur Inkubation 30 Minuten genügen. Dabei ist der Latex- und Gammaglobulinverbrauch geringer als bei der Originallatexmethode. T a n n e r [43] führte den Test in Kapillarröhrchen aus, wobei das zu verwendende Gammaglobulin bei 63 Grad C kurz erhitzt und dann rasch abgekühlt wird. Damit werden in 85% positive

Ergebnisse angegeben. Die fälschlich positiven Resultate betragen 2 bis 3%. Betreffend den Prozentsatz der positiven Ergebnisse scheint die Medofikation des Originallatextestes mit der Einröhrchenmethode besonders verläßlich (90% positiv). Die Methode wurde von Singer und Plotz [44] angegeben. An Stelle des im Originaltest verwendeten Gammaglobulins wird körpereigenes verwendet, welches man durch Ammoniumsulfatausfällung erhält. Der Arbeitsvorgang benötigt natürlich längere Zeit. Titerveränderungen können nicht registriert werden. Bei Lupus erythematodes visceralis ist er in 12% positiv. Dies ist insofern auffallend, da mit dem Originaltest nicht so hohe Prozentsätze auftreten.

Hinsichtlich der Zeitersparnis ist wohl die "Objektträgermethode" des Latexfixationstestes von Singer und Plotz [45] (bei der dem Serum oder Fingerbeerenblut eine Eosinlösung mit Latexpartikeln zugesetzt wird und die auftretende Agglutination in positiven Fällen mit dem bloßen Auge abgelesen werden kann), und der von den Hyland-Laboratorien, Los Angeles, und Serum-Institut Molter, Heidelberg, und Behring-Werke, Marburg, ausgearbeitete Latex-Schnelltest bzw. Latex-RF-Test bzw. Latex-Tropfentest (LTT) bzw. Rheumatoid-Arthritis-Test (RA-Test) unübertroffen [46]. In den handelsüblichen Reagentien (Latex-Schnelltest), ist der Latex-Indikator bereits mit Gamma-Globulin beladen. Auf dem Objektträger wird dieses Indikatorgemisch dem mit einer Pufferlösung verdünnten Patientenserum zugegeben. Der Test kann mit verschiedenen Verdünnungen ausgeführt werden. Die mit dem bloßen Auge ablesbare Agglutination wird in Stufen angegeben: +, ++, +++ bzw. +, (+), +, ++. Die Reaktion ist auch in kleineren Krankenhäusern und in der Praxis in 5 Minuten durchführbar [48]. Egghart und Wiedermann [50] sowie Müller und Schupp [52] berichten über ihre Untersuchungsreihen.

Schließlich sind noch zwei weitere Medofikationen des Latex-Testes zu erwähnen. Einmal haben Wiedermann, Egghart und Braunsteiner [54] durch hypertone Peristonlösung eine Ausfällung der Euglobuline und der Lipoproteine durchgeführt und anschließend die Bestimmung wie beim Latex-Fixationstest vorgenommen. Es handelt sich hier in gewisser Weise um eine Parallele zum Vorgehen von Ziff [23, 13] im Sinne eines Inhibitions-

testes. Beim Bentonit-Flockungstest nach Bozicewich, Bunim und Mitarbeiter [58, 60] werden mit Methylenblau gefärbte Bentonitpartikelchen als Indikator und Gammaglobulin-Fraktion II als Reaktor verwendet und mit inaktiviertem Rheumatikerserum versetzt.

Recht interessant ist der Kurztest von Epstein und Mitarbeitern [47, 49], bei dem auf eine Trägersubstanz für das Gammaglobulin verzichtet wird. Es wird Patientenserum mit einem auf einem bestimmten Stickstoffgehalt eingestellten Gammaglobulin in Reaktion gebracht und die dabei entstehende Präzipitation als positiver Ausfall gewertet. Die Genauigkeit ist sehr hoch (90%). Fälschlich positive Ergebnisse sind nicht in größerem Ausmaß zu verzeichnen als beim Latextest. Auch Kleine und Mitarbeiter [51] verzichten auf eine Trägersubstanz und stellen den Ausfall der Reaktion mittels Streulichtmessung auf photoelektrischem Wege fest. Diese Methode ist an eine recht kostspielige Apparatur gebunden.

Eine deutliche Verbesserung der bisher beschriebenen Teste ist durch eine vorhergehende Präparation des zu untersuchenden Patientenserums zu erreichen. Als erste Methode dieser Reihe wurde 1954 von Svartz und Schlossmann [53] die Durchführung des Hämagglutinationstestes mit dem Kältepräzipitat des zu prüfenden Serums angegeben. Der Arbeitsgang ist leider langwierig und setzt eine Kältezentrifuge voraus. Die Resultate sind jedoch überaus genau. Das gleiche gilt von dem Euglobulintest nach Ziff und Mitarbeitern [23] sowie von Olsen [55] und weiter von dem Latextest mit dem Kältepräzipitat des zu prüfenden Serums [56]. Egghart, Wiedermann und Braunsteiner ihrer Erfahrung nach kommt der von ihnen entwickelte Periston-Latex-Test [56] bezüglich Genauigkeit den zuletzt angeführten Testen gleich. Seine Durchführung ist verhältnismäßig einfach und rasch. Dabei wird mit einer hypertonen Peristonlösung ein Präzipitat des zu prüfenden Serums gewonnen und damit der Latex-Test durchgeführt.

Die Ursache der besseren Ergebnisse mit dem Kältepräzipitat versuchten Svartz und Schlossmann [24] mit der Ausschaltung eventuell im Serum vorhandener Hemmkörper zu erklären. Für das Vorhandensein solcher Hemmkörper könnte das Prozonenphänomen beim Latextest sprechen. Es besteht darin, daß der Latex-Test erst

bei höheren Verdünnungen positiv wird. Wenn nun der zu erwartende Titer eines Rheumatikerserums niedriger ausfallen würde als die Prozone, müßte das Resultat fälschlich negativ werden. Vor kurzem konnte B r i n e und Mitarbeiter [57] dieses Prozonenphänomen durch vorheriges Erhitzen der Sera und durch Kalzium- oder Magnesiumzusatz oder durch Vorbehandlung mit Ammoniumsalzen vermeiden. Sie schlossen daraus, daß ein Serumkomplement für das Zustandekommen einer Prozone verantwortlich sein müsse, und empfahlen eben zur Vermeidung das vorherige Erhitzen der Sera. Dies dürfte jedoch nicht der einzige Hemm-Mechanismus sein. T a n n e r [43] gelang es nicht, durch vorhergehendes Erhitzen latex-negativer Sera die Resultate wesentlich zu verbessern. In diesem Zusammenhang ist es erwähnenswert, daß auch Sulfonamidverbindungen auf dem Hämagglutinationstest eine hemmende Wirkung ausüben können [59]. Z i f f [23] konnte 1956 zeigen, daß von Normalpersonen gewonnenes Euglobulin den positiven Ausfall des F-II-Testes verhindern kann. Dieser Hemmeffekt wurde bei über 90% der von ihnen untersuchten Normalpersonen gefunden. V a u g h a n und G o o d [61] fanden bei einem anderen System (mit inkompletten Anti-Rh sensibilisierten Rh-positiven Erythrozyten) denselben Effekt bei 75% normaler Nativsera. Ob die Differenz der Resultate durch die unterschiedlichen Systeme bedingt ist, wird noch Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Auch G r u b b [63] fand 1956, daß 60% seiner Normalsera die Agglutination Rh-positiv sensibilisierten Erythrozyten durch Rheumatikerseren verhindern können.

Sowohl der Hämagglutinationstest, der F-II-Test, der Latex-Test, sowie alle ihre Medifikationen basieren auf der Eigenschaft des "Rheumafaktors" mit Gammaglobulin eine Bindung einzugehen. Ein gewisser Unterschied unter den Methoden scheint jedoch zu bestehen. So fanden K u n k e l und Mitarbeiter [29] bei Hepatitiden, Sarcoidose und Kala Azar bis zu 12% positive Latex-Teste mit Titerwerten bis zu 40 000. Der F-II-Test war dabei ebenfalls positiv, der Schafzellentest hingegen negativ. Bei Seren von Rheumatikern konnten E g g h a r t , W i e d e r m a n n und B r a u n s t e i n e r nie eine derartige Diskrepanz beobachten. Den höchsten Prozentsatz fälschlich positiver Befunde erhielten sie bei Cirrhosen (4 latex-positive Fälle unter 40 untersuchten). Nun konnte von K u n k e l bei sämtlichen von ihm untersuchten fälschlich positiven

Sera eine Fraktion gefunden werden, die sich in der Ultrazentrifuge wie der Rheumafaktor verhält [29]. Es kann also auch bei einigen anderen Erkrankungen ein Globulin auftreten, welches sich physikalisch-chemisch und demnach auch serologisch wie der Rheumafaktor verhält.

Von Ziff und Mitarbeitern [23, 13], Hess [72], Craig und Mitarbeitern [62] sowie Miehlke und Puttnims [64] wurde mit dem sog. Euglobulintest bzw. Euglobulinfraktionierung günstige Ergebnisse erzielt. Der Test arbeitet mit einer durch Dialyse gegen verdünnten Citratphosphat-Puffer (1/150 M Citrat-Phosphat-Puffer von pH 5,8) gewonnenen Euglobulinfraktion, und sie basiert in seinem Ansatz auf der Annahme, daß sich im Rheumatikerserum neben dem für die Agglutination von sensibilisierten Schaferythrozyten verantwortlichen Faktor noch ein Hemmfaktor in der Euglobulinfraktion findet [65], der auch im Normalserum enthalten ist. In der Euglobulinfraktion des Rheumatikers können deshalb beide Faktoren neutralisiert sein. Wenn man einer solchen Euglobulinfraktion ein bekannnt positives Rheumaserum zufügt, erfolgt keine Beeinflussung der Agglutinationsfähigkeit. Dieser Test besitzt jedoch lediglich wissenschaftliches Interesse, da er in der Durchführung für routinemäßige Untersuchungen zu schwierig ist. Nach Svartz [67], Ziff [68] und Whillans und Fishmann [70] lassen sich im Serum vorhandene hämagglutinationshemmende Substanzen auch durch Fraktionierung mit Ammoniumsulfat eliminieren.

Schließlich geben Müller und Mitarbeiter [51, 75] die sog. Grenzschichtreaktion an, bei der 1:6 mit Borat-Kochsalzpuffer (pH 8,0) verdünntes Patientenserum und 30 Minuten auf 63 Grad C erhitzte 0,5%ige Gamma-Globulinlösung verwandt wurde.

Die Bevorzugung eines bestimmten Testes wird in erster Linie von den Erfahrungen des jeweiligen Labors abhängen, welches meist auf einen bestimmten Test spezialisiert und in seiner Handhabung am besten vertraut ist. Mit dem Original-Latex-Test erhielten Egghart, Wiedermann und Braunsteiner [32, 40] in etwa 80% positive Resultate. Der Schafzellentest reicht nicht an diesen Prozentsatz heran. Die Durchführung mit dem Kältepräzipitat bessert die Ergebnisse erheblich, sie ist jedoch wegen seiner Kompliziertheit als Routinemethode wenig geeignet

Der Periston-Latex-Test ist einfacher, die Ergebnisse sind ausgezeichnet (über 90%). Weiter liefern ausgezeichnete Ergebnisse: die Kapillarmethode von Tanner, der Epstein-Test und der Einröhrchen-Test von Singer und Plotz. Die zuletzt genannten Methoden haben außerdem den Vorteil der raschen Durchführbarkeit. In dieser Beziehung sind der "Slide Latex Fixation Test" und der RA-Test der Hyland-Laboratorien (Los Angeles) unübertroffen. Nach der Erfahrung von Egghart, Wiedermann und Braunsteiner [32, 40] sind die Ergebnisse beider Teste identisch. Ein Vergleich mit dem Original-Latex-Fixationstest ergab praktisch gleiche Resultate.

Im Vergleich zu den bisher beschriebenen Testen sind andere Methoden der serologischen Diagnostik von geringerer Bedeutung. Dazu gehören z.B.: Hautproben mit intrakutanen Quaddeln von Rheumatikerseren, ein erhöhter Haptoglobulinspiegel, die Feststellung einer sehr niedrigen Histaminbindungsfähigkeit von Rheumatikerseren, der Sublimatflockungstest, der Bentonitflockungstest [76, 29, 78, 80, 82, 84] usw. Alle diese Methoden haben sich nicht durchgesetzt und besitzen keine Vorteile gegenüber dem Latex-Test.

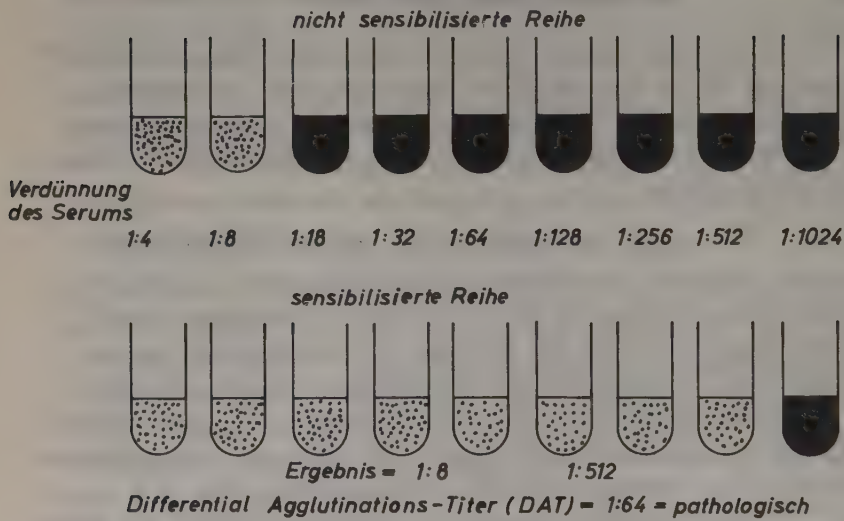
Die Hämagglutinationsreaktionen

Wie die Streptokokken-L-Agglutination (eine serologisch unspezifische Reaktion zum Zwecke des indirekten Nachweises einer Erkrankung an rheumatoider Arthritis "Polyarthritis rheumatica primaria") dienen auch die Hämagglutinationen ausschließlich der Diagnostik der chronischen Polyarthritis.

M e y e r [33] scheint der erste zu sein, der eine Agglutination von sensibilisierten Schafblutkörperchen beobachtete. Er fand sie in sehr seltenen Fällen bei der Anstellung der Wassermann'schen Reaktion (8mal unter etwa 100 000 WaR). Die Agglutination kam nur zustande, wenn er sensibilisierte Erythrozyten benutzte. Nur für zwei der beobachteten Seren gibt er eine Diagnose an. In einem Falle handelte es sich um eine Lebercirrhose, im anderen um eine chronische Bronchitis. Diese Befunde gerieten in Vergessenheit, bis W a a l e r [66] erneut auf diese Erscheinung aufmerksam machte. Bei Untersuchungen über die Komplementfixation fand er, daß die Agglutinationskraft von Kaninchenambozeptor für Schaferythrozyten durch Zugabe von Rheumatikerserum, und zwar von Kranken mit primär-chronischer Polyarthritis, gesteigert werden kann. Die "agglutination activating activity" fand er als thermostabil, an Globulin gebunden und nicht durch Schaferythrozyten absorbierbar. Da er nun bei 35% der Rheumatiker dieses Phänomen fand, schenkte er ihm keine weitere Beachtung. Einige Jahre später, 1948, entdeckten R o s e , R a g a n , P e a r c e und L i p m a n [35] das Phänomen erneut. Da 100% der von ihnen untersuchten Fälle aktiver rheumatoider Arthritis (allerdings nur 27 Kranke) einen positiven Test ergaben, rückte die Reaktion in das Blickfeld der Diagnostik. Sie waren die ersten, die die Bezeichnung Differentialagglutinationstest (DAT) einführten. Da im menschlichen Serum ein heterophiler Antikörper gegen Schafblutkörperchen vorkommt, mußte dieser mit nicht sensibilisierten Erythrozyten bestimmt werden und dazu der Titer mit sensibilisierten Blutkörperchen zur Feststellung des "rheumatoid arthritis serum"-Faktors (RAS-Faktor). Das Ergebnis wird dann als Quotient beider Titer angegeben (Abb. 1).

(Abb. 1)

Schema des Differential-Agglutinations-Testes nach ROSE (DAT)



Differential Agglutinations-Titer (DAT) = 1:64 = pathologisch

In diesem gewählten Beispiel der Abb. 1 nach K ö h l e r [86] findet sich in der Patientenserumreihe mit nicht sensibilisierten Schaferythrozyten Agglutination bis zu einer Serumverdünnung von 1:8, in der Reihe mit sensibilisierten Blutkörperchen bis zu 1:512 (1:8 : 1:512). Damit errechnet sich ein Differentialagglutinationstiter von 1:64 (über die Bewertung s. später).

Dieser Test wurde zunächst durch eine Sensibilisierung mit unterschiedlichen Ambozeptordosen etwas modifiziert. Eine wesentliche Abwandlung erfolgte, als man daran ging, die heterophilen Antikörper vor Ansatz des Testes zu absorbieren. Die ersten Versuche dazu machten J a w e t z und H o o k [69], die Rindererythrozyten und Meerschweinchennierenzellen benutzten. H e l l e r , J a c o b s o n und K o l o d n y [71] gingen einen Schritt

weiter, indem sie gewaschene Schafblutkörperchen zur Absorption der heterophilen Antikörper benutzten. In gleicher Weise gingen Ball [73] und Svartz und Schlossmann [74] vor, die alle in geringem Maße unterschiedliche Modifikationen einführten. Die nächste Stufe wurde erreicht, als Heller, Jacobson, Kolodny und Schuman [37] und Winblad [77] dem Testansatz tierische Seren (meist Schafserum) zusetzten und damit eine erhöhte Agglutinabilität erzielten. Der nächste Schritt war die Verwendung menschlicher Blutkörperchen der Gruppe O, Rh negativ. Da diese Erythrozyten keine Agglugene enthalten, ist die vorangehende Absorption nicht notwendig. Auch hier kennt man mehrere Modifikationen, je nachdem, ob zur Sensibilisierung Kaninchen- oder Pferdeambozeptor benutzt wird. Pike, Sulkin und Coggeshall [79] hatten zunächst mit der Verwendung von menschlichen Erythrozyten keinen Erfolg, konnten aber die erfolgreichen Ergebnisse von Wager [81] schließlich doch bestätigen. Mit diesen Methoden waren aber die Möglichkeiten noch nicht erschöpft. Svartz und Schlossmann [85] führten eine Teilfraktionierung des Serums mit CO_2 durch, ein Verfahren, das später durch die Kältepräzipitation ersetzt wurde [53]. Ähnliche Ergebnisse erhielten Ziff, Brown, Lospalluto, Badin und McEwen [23], Hess [72], Craig, Kerby und Persons [62] u.a. mit einer durch Dialyse erhaltenen Euglobulinfraktion. Das Verfahren ist zu umständlich, als daß es für die Routinediagnostik bedeutsam werden könnte.

Die Sensibilisierung läßt sich auch mit der Fraktion II (Gamma-Globulin) vornehmen, der sog. F-II-Test. Winblad [77] hatte festgestellt, daß verdünntes Kaninchenserum die Agglutination sensibilisierter Schafblutkörperchen inhibiert (Reduzierung des Titeres von 1:256 auf 1:16). Nach den Untersuchungen von Heller, Jacobson, Kolodny und Kammerer [39] üben auch mehrere menschliche Seren eine hemmende Wirkung aus und die Hemmsubstanz fand sich eben in der Fraktion II, der Gamma-Globulinfraktion. Zum Test werden die Schaferythrozyten mit Tannin behandelt, mit Fraktion II sensibilisiert und dann dem zu untersuchenden Serum zugegeben. Positive Ergebnisse sind in etwa 69% der Fälle von rheumatoider Arthritis zu erwarten (Jacobson et al.) [90]. Voraussetzung zu diesem F-II-Test sind inaktivierte und absorbierte

Seren (Angaben nach Ziff) [13].

Der für das Zustandekommen der Agglutination sensibilisierter Blutkörperchen durch rheumatoide Arthritisseren verantwortliche Faktor (= rheumatoide Arthritis Serumfaktor = RAS-Faktor) ist auf keinen Fall ein echter Antikörper.

Es sind seit der Entdeckung dieser Hämagglutinationsreaktionen viele Arbeiten erschienen, die sich bemühten, das Problem zu lösen, ohne bisher von vollem Erfolg gekrönt zu sein.

Die Annahme von Hobson und Gorill [91], daß der RAS-Faktor der hitzestabilen vierten Komponente des Komplements (C 4) nahe verwandt sei, wurde bald aufgegeben.

Je nach der Art der Serumfraktionierung fand man den Hämagglutinationsfaktor nun bald in der Gamma-, bald in der Beta-Globulinfraktion, teils auch in beiden.

Die neuesten Arbeiten von Svartz [92] und Svartz, Carlson, Schlossmann und Ehrenberg [93] legen nahe, daß der RAS-Faktor hauptsächlich an das Gamma-Globulin gebunden ist. Die Ultrazentrifugation des Kältepräzipitates der Seren ergab, daß der Hämagglutinationsfaktor ein Makroglobulin mit einer Sedimentationskonstanten von 18, 7 S ist. Ähnliche Befunde, wenn auch nicht so detailliert, erhoben Franklin, Kunkel, Müller-Eberhard und Holman [11].

Die Angaben über Bindung an das Beta-Globulin wurden immer dann gemacht, wenn die Serumfraktionierung mit Äthanol vorgenommen wurde. Zum gleichen Ergebnis führte, soweit ersichtlich, nur noch die Natriumsulfatfraktionierung (Robinson et al, [94]) und letzthin die Fraktionierung nach Cohn, Methode 10, durch Swahn und Grubb [95].

Die Reaktion ist nicht nur mit Schafblutkörperchen und O-Menschenblutkörperchen durchführbar, sondern auch mit Rh-positiven Menschenblutkörperchen, die mit Anti-Rh-Serum sensibilisiert wurden (Foz et al. [96], Waller et al. [4], Grubb [63, 97]), wobei es gelegentlich zum Prozonenphänomen kommen kann (Swahn und Grubb [95]). Ferner menschliche Erythrozyten der Gruppe A

bei entsprechender Sensibilisierung (W a g e r [81] und G r e e n - b u r y [98]); Meerschweinchenblutkörperchen (W a g e r [81]) und Blutkörperchen von Küken (W a g e r [81]), Ziegen (P i k e et al. [79]) Mäusen (H o b s o n und G o r i l l [91]) und Rindern (P i k e et al. [79]). Zweifelsohne sind auch die Blutkörperchen anderer Spezies verwendbar, wie ja auch Polystyren-Latex-Partikel "sensibilisiert" werden können (S i n g e r und P l o t z [5] und R o t h e r - m i c h und P h i l i p s [99]). Es ist auch nicht nötig, die Sensibilisierung mit dem homologen Antikörper vorzunehmen, wenn man durch Tanninbehandlung die Erythrozytenoberfläche entsprechend verändert. Darauf beruht z.B. der F-II-Test oder die Beladung der Erythrozyten mit Beta-hämolysierenden Streptokokken oder deren Spaltprodukten. Es ist ferner möglich, als Ambozeptor (bei der Verwendung von Schafblutkörperchen) ein Kaninchenantiserum gegen Ziegenerythrozyten oder Meerschweinchennierenzellen (=Forssman-Antigen) zu verwenden (P i k e et al. nach S c h m i d t [100]).

Aus allem geht hervor, daß es sich hier nicht um eine Antigen-Antikörper-Reaktion im engeren Sinne des Wortes handeln kann. Es handelt sich vielmehr, wie Z i f f [13] ausführt, um eine Reaktion des RAS-Faktors mit einem nicht spezifischen Faktor der Gamma-Globulin-Fraktion. Es liegt nahe, daß der rheumatoide Serumfaktor als Autoantikörper gegen das körpereigene Globulin wirkt. Aber auch hier liegt noch alles im Unklaren.

Nach den voranstehenden Ausführungen stehen folgende Testverfahren und deren Modifikationen zur Verfügung:

1. W a a l e r - R o s e -Reaktion = DAT (Differentialagglutinationstest)
2. H e l l e r - S v a r t z - S c h l o s s m a n n -Reaktion (vorangehende Absorption der heterophilen Antikörper)
3. H e l l e r -Reaktion = S.E.A.-Test (Serum-Erythrozyten-Agglutination) (Zugabe von Schafserum zu einer Testreihe, ohne Serum in der Vergleichsreihe)
4. Hämagglutinationstest mit menschlichen Erythrozyten O rh.
5. Kälteglobulintest nach S v a r t z - S c h l o s s m a n n
6. Euglobulintest nach Z i f f et al. und H e s s
7. F-II-Test.

1. W a a l e r - R o s e -Test (DAT): Differentialagglutinationstest

Ambozeptor: Benutzbar ist käuflicher oder selbsthergestellter W a a l e r [66]) Ambozeptor.

Schafblutkörperchen: [87] Die Erythrozyten eines jeden Schafes eignen sich nicht. Im Vorversuch müssen mit sicher positiven Seren unter dem Tierbestand die Schafe ermittelt werden, die für die Testung geeignet sind. Das durch Schütteln mit Glasperlen defibrinierte Blut wird dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und vom Bodensatz eine 2%ige Aufschwemmung hergestellt.

Sensibilisierung: Zunächst wird der hämagglutinierende Titer ermittelt. Der Ambozeptor wird in den Verdünnungen 1:200 - 300 - 400 - 500 - 600 ... 1200 in 0,5 ml Mengen angesetzt und 0,5 ml der 2%igen Erythrozytenaufschwemmung zugegeben. Für 1 Stunde wird bei 37 Grad C bebrütet und dann über Nacht in den Kühlschrank bei 4 Grad C gestellt. Nach kräftigem Schütteln wird abgelesen. Als Endpunkt gilt die Verdünnungsstufe, in der noch eben mit dem unbewaffneten Auge sichtbare feinkörnige Agglutination eintritt. - Sensibilisiert wird mit dem vierten Teil der minimalen Agglutinationsdosis (die Sensibilisierungsdosis schwankt bei den verschiedenen Autoren zwischen einem Drittel bis einem Fünftel der minimalen Agglutinationsdosis). Tritt demnach Agglutination noch in der Verdünnung 1:500 ein, wird mit 1:2000 sensibilisiert. Zu diesem Zwecke wird die gleiche Menge 2%ige Schafblutkörperchenaufschwemmung mit dem gleichen Volumen der Ambozeptorverdünnung versetzt und 1/2 Stunde bei 37 Grad C im Wasserbad bebrütet.

Ansatz des Testes: Das 30 Minuten bei 56 Grad C inaktivierte Serum wird in den Verdünnungen 1:2 bis 1:1024 in 0,5 ml-Mengen in 2 Reihen abgesetzt. In die erste Reihe wird 0,5 ml einer 1%igen nicht sensibilisierten Schafblutkörperchenaufschwemmung gegeben, in die zweite Reihe bringt man 0,5 ml der sensibilisierten Schafblutkörperchen. Die endgültigen Serumverdünnungen belaufen sich demzufolge auf 1:4 bis 1:2048. Es wird eine Stunde bei 37 Grad C bebrütet und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Am nächsten Morgen wird abgelesen, und zwar in gleicher Weise wie beim Vorversuch.

Nach Abbildung 1 muß nun der Differentialagglutinationstiter er-

rechnet werden. Als Ergebnis gilt der Quotient der reziproken Titer beider Reihen:

$$\frac{\text{Reziproken Titer der sensibilisierten Reihe}}{\text{Reziproken Titer der nicht sensibilisierten Reihe}} = \text{Differentialagglutinationstiter}$$

Nach dem in Abbildung 1 gewählten Beispiel wäre dies

$$\frac{512}{8} = 64$$

Dieser Titer von 1:64 wäre als pathologisch zu bewerten, da Titer ab 1:16 als erhöht zu betrachten sind.

2. H e l l e r - S v a r t z - S c h l o s s m a n n -Reaktion

Der Test unterscheidet sich vom DAT dadurch, daß das Serum von den heterophilen Antigenen befreit wird, so daß der Ansatz der nicht sensibilisierten Reihe entfallen kann.

Absorption des Patientenserums: Auch hier gibt es die verschiedensten Vorschriften. Mit bestem Erfolg sind die Angaben von S e i f e r t und T i c h y [101]. Ein Teil inaktiviertes Patientenserum wird mit einem Teil Sediment gewaschener Schafblutkörperchen gemischt und 1 Stunde bei 37 Grad C bebrütet. Danach werden die Blutkörperchen abzentrifugiert.

Ansatz des Testes: Das absorbierte Serum wird in 0,5 ml Mengen in den Verdünnungen 1:4 bis 1:512 angesetzt. Dazu kommt 0,5 ml sensibilisierte (wie oben) Schafblutkörperchenaufschwemmung. Bebrütet wird 1 Stunde bei 37 Grad C und nach Kühlschrankaufenthalt über Nacht abgelesen.

3. Die H e l l e r 'sche Reaktion (SEA-Test)

Das Prinzip der Reaktion besteht darin, daß 2 Verdünnungsreihen des zu untersuchenden Serums angesetzt werden, die eine mit physiologischer Kochsalzlösung, die andere mit einer 5%igen Schafserumverdünnung. Ist der Titer in der Serumreihe um mindestens das Vierfache höher als in der Kochsalzreihe, dann wird der Test als positiv be-

zeichnet.

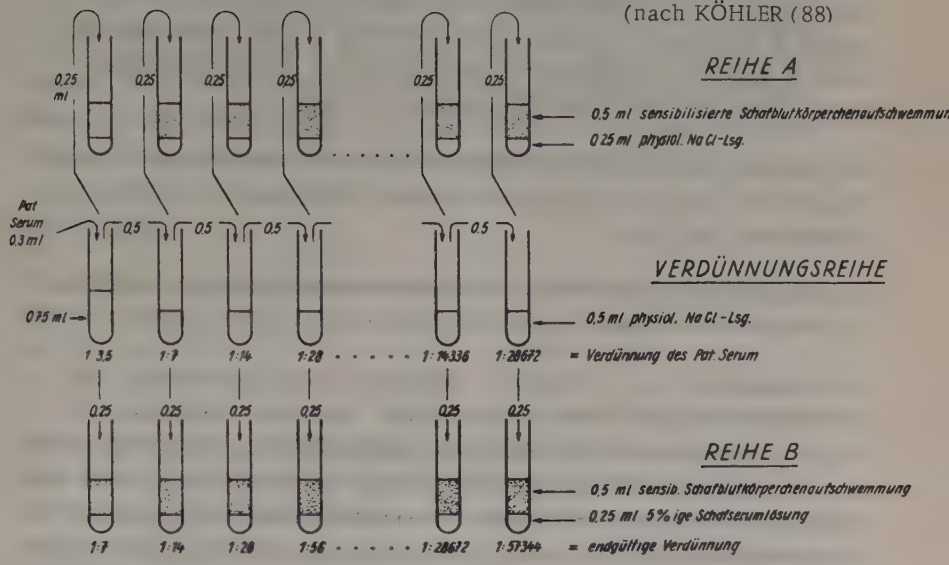
Ansatz: [37] Die sensibilisierte Schafblutkörperchenlösung wird in der Form bereitet, daß gleiche Mengen einer 0,5%igen Schafblutkörperchenlösung und einer Ambozeptorlösung, die einem Zwanzigstel des Basisagglutinintiters entspricht, gemischt werden (Basisagglutinintiter = Titer des Ambozeptors gegen unbehandelte Schafblutkörperchen).

Von den zu untersuchenden Seren werden zweifache Verdünnungen von 1:3,5 bis 1:28672 mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt und zu je 0,25 ml in zwei Röhrchenreihen (A und B) eingefüllt. Die Reihe A erhält dann noch 0,25 ml physiologische Kochsalzlösung, die Reihe B 0,25 ml 5%iges Schafserum (verdünnt mit physiologischer NaCl-Lösung), wodurch eine nochmalige Verdünnung um das Zweifache eintritt (1:7 - 1:59344). Jedem Röhrchen wird 0,5 ml sensibilisierter Schafblutkörperchenaufschwemmung zugefügt. Als Kontrollen dienen Röhrchen mit physiologischer Kochsalzlösung bzw. Schafserum ohne Patientenserum und sensibilisierte Schafblutkörperchen.

Nach Mischung aller Testflüssigkeiten schütteln und über Nacht in den Kühlschrank stellen. Ablesung am nächsten Morgen. Als Endtiter gilt das Röhrchen mit 1 + Agglutination (= feinkörnige Agglutination nach mäßigem Schütteln) in der höchsten Serumverdünnung. Als Serumverdünnung wird dabei die Verdünnung vor Zugabe der Blutkörperchenaufschwemmung gerechnet. Schematische Darstellung dieses Vorganges in Abbildung 2. Das inaktivierte Patientenserum ist vorher mit Schafblutkörperchen von heterophilen Antikörpern zu befreien.

Der Test beruht auf der Beobachtung, daß der Zusatz tierischen oder menschlichen Serums zu einer Mischung von Schaferythrozyten und dem homologen Agglutinin den Agglutinationstiter potenziert. Die erste derartige Beobachtung stammt aus dem Jahre 1911 von D e a n [102] und wurde später u.a. von O l s e n [34] bestätigt. Ausführlichere Untersuchungen zu diesem Problem legte W i n b l a d [77] 1951 vor. - Die Agglutination wird in ähnlicher Weise auch von Meerschweinchen-, Rinder-, Ziegen- und Pferdeserum stimuliert [103].

Abb. 2. Schema der Heller-Reaktion (SEA-Test)
(nach KÖHLER (88)



4. Hämagglutinationstest mit menschlichen Erythrozyten O rh

W a g e r [81] zeigte, daß auch menschliche Erythrozyten der Gruppe O durch das Serum der primär chronischen Polyarthritiker agglutiniert wurde, nachdem einige vorangegangene Versuche durch P i k e et al. [79] und van L o g h e m - L a n g e r e i s [104] fehlgeschlagen waren.

Versuche mit menschlichen Erythrozyten wurden von mehreren Autoren vorgenommen, u.a. von F o z , B a t a l l a und B a r c e l ó [105], P i k e , S u l k i n und B u r d e t t e [103], D i c k g i e s s e r und H a r t e r [106], G i b s o n und L i n g [109], J a q u e l i n e , P o d l i a c h o u k und E y q u e m [107, 108].

Die folgende Technik ist die nach G i b s o n und L i n g [109]. Das Antimenschenblutserum wird durch Injektion von Menschenblut der Gruppe O rh bei Kaninchen gewonnen. Die Immunisierung erfolgt nach nachstehendem Modus. Die Blutzellen werden in Alsever-Lösung (Zusammensetzung der modifizierten Alsever-Lösung: 18,66 wasserfreie

Dextrose; 4,18 NaCl; 8,0 Dihydro-Na-Zitrat; 1000,0 Aqua bidest. [100]) aufgefangen und dreimal gewaschen. Sieben intraperitoneale Injektionen á 1 ml und 2 intravenöse Injektionen á 5 ml im Abstand von 2 bis 3 Tagen. Der Agglutinationstiter sollte 1:10000 betragen. Danach wird das Tier durch Herzpunktion entblutet.

Die Sensibilisierung der Erythrozyten für den Test wird mit einem Viertel der minimalen Agglutinationsdosis vorgenommen. Die Erythrozytenlösung ist 1%ig.

Der Ansatz des Testes erfolgt in gleicher Weise wie der W a a l e r - R o s e -Test.

Eine Absorption der heterophilen Antikörper ist nicht nötig. Für den Test können, wie G i b s o n und L i n g angeben, die eigenen Blutzellen des Patienten Verwendung finden, damit also auch die Zellen anderer Blutgruppen. Das bringt den Vorteil mit sich, daß für den Test nur der Ambozeptor und das Patientenblut (geronnen) notwendig sind. Alle übrigen Autoren benutzen jedoch ausschließlich Erythrozyten der Gruppe 0.

5. Kälteglobulintest nach S v a r t z - S c h l o s s m a n n

Das Kältepräzipitat wurde nach den Angaben von S v a r t z und S c h l o s s m a n n [160] hergestellt. Hierzu wurde ein Volumen mit 14 Volumen destillierten Wassers von 4 Grad C versetzt und 48 Stunden im Kühlschrank bei 4 Grad C gehalten. Nach dieser Zeit erscheint das Präzipitat bereits als Bodensatz. Es wurde jedoch noch zusätzlich für 2 Stunden bei 3000 U/Min. in der Kälte zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat wieder mit physiologischer NaCl-Lösung auf das Ausgangsvolumen aufgeschwemmt.

6. Euglobulintest

Der Euglobulintest hat wohl wissenschaftliches Interesse, ist aber für die Routinediagnostik infolge umständlicher Technik nicht brauchbar [23, 13, 62, 64, 65, 72]. Z i f f und Mitarbeiter [23] beschreiben eine Methode zur Bereitung der Euglobulinfraktion durch Verdünnung des Serums mit einem gleichen Volumen destillierten Wassers und Dialyse gegen ein gleich großes Volumen von 1/150 M

Citrat-Phosphat-Puffer von pH 5,8 über 48 Stunden. Mathies und Fürnrohr [158] wandten die weniger zeitraubende von Vaughan, Broome und Howell [159] angegebene Methode an, nach der ein Volumen mit neun Volumen 0,0027 n Salzsäure verdünnt und 20 Minuten bei 4000 Umdrehungen zentrifugiert wurde. Nach Abgießen des Überstandes vom Zentrifugat wurde mit physiologischer Kochsalzlösung auf das Anfangsvolumen aufgefüllt.

7. F-II-Test

Der F-II-Test hat wohl wissenschaftliches Interesse, ist aber für die Routinediagnostik infolge umständlicher Technik nicht brauchbar [23].

0,1 ml des zu untersuchenden Serums werden zu 5 ml 1,64 M Ammoniumsulfat hinzugefügt. Die Mischung wird 1 Stunde lang gekühlt (+ 4 Grad C) und 10 Minuten lang bei 2300 - 3000 Touren/Min. zentrifugiert. Das Ammoniumsulfat-Präzipitat wird in 0,5 ml Glycin-Puffer gelöst und mit einer Lösung bestehend aus 0,05 ml Latex-Suspension in 9,5 ml Puffer gemischt [23].

2 ml dieser Mischung werden 1 1/2 Stunden lang gekühlt (+4 Grad C). Die Röhrchen werden 3 Minuten lang mit 2300 Touren/Min. zentrifugiert und danach auf Agglutination getestet [89].

Bloch [89] berichtet, daß von 250 rheumatoiden Seren im Ein-Röhrchen-Test 225 (90%) positiv waren. Von 1128 ebenso getesteten Kontrollseren waren 41 (3,6%) positiv.

Bewertung der Hämagglutinationstiter

Die Angaben über die als "positiv" zu wertenden Titer schwanken erheblich, wie auch bei der Streptokokken-L-Agglutination. Um die Ergebnisse verschiedener Autoren vergleichen zu können, ist es erforderlich, sich vorher über die Festlegung der Titergrenzen zu orientieren.

1. Waaler-Rose-Test (DAT): Die Hämagglutinationsreaktion in Form des DAT wird heute nicht mehr von vielen Untersuchern angestellt. Gamp und Gillissen [111] bewerten DAT von 1:32 und höher als positiv, Titer von 1:16 und weniger

als negativ. Jacob und Roemer [112] betrachten den Titer von 1:16 als pathologisch, 1:8 als verdächtig. Nach Untersuchungen von Köhler gilt das gleiche, den Titer von 1:16 als positiv zu bewerten.

2. Heller-Svartz-Schlossmann-Test: Von den meisten Autoren wird der Test bei Agglutination bis zur Verdünnung 1:64 und darüber als positiv betrachtet (u.a. Svartz und Schlossmann in ihren Arbeiten; Jaqueline et al. [107]; Alexander und de Forest [113]). Es finden sich jedoch auch Angaben, die den pathologischen Titer niedriger ansetzen: 1:42 (zweifelhaft bei 1:28) = Martin und Fleury [114]; 1:40 = Winblad [115]; 1:32 = Frank und Schimanski [116]; 1:16 = Seifert und Tichy [101] und Daneo und Einaudi [117]; 1:4 = Modifikation nach Ball [118].

3. Heller-Test (SEA-Test): Wie schon ausgeführt, gilt der Ausfall des Testes dann als positiv, wenn der Agglutinationstiter in der Serumreihe mindestens um das Vierfache höher liegt als der Titer in der Kochsalzreihe.

4. Hämagglutinationstest mit menschlichen Erythrozyten 0 rh: Als pathologisch erhöht ("positiv") gilt eine Agglutination in der Serumverdünnung 1:32 und höher, als zweifelhaft bei 1:16 und als negativ 1:8 und weniger (Jaqueline et al. [107]).

5. Kälteglobulintest nach Svartz-Schlossmann: Als positiv gelten Agglutinationstiter von 1:16 und höher (Svartz [110]

6. Euglobulintest: Dieser wird nur selten ausgeführt und gilt nach Ziff et al. [23] ab 1:14 als positiv, nach Jaqueline et al. [107] ab 1:64 (etwas andere Technik als Ziff).

Der Inhibitionstest

Das Serum von Kranken mit primär chronischer Polyarthritis besitzt die Fähigkeit, Körper verschiedener Art zu agglutinieren. Diese Fähigkeit ist abhängig von der Anwesenheit eines Faktors in der Gammaglobulinfraktion dieser Kranken, den man wegen seiner weitgehenden Spezifität für das Leiden "Rheumafaktor" nennt. Der Rheumafaktor ist durch hohes Molekulargewicht charakterisiert und findet sich bei der ultrazentrifugalen Untersuchung mit einer Sedimentationskonstante von 19 S. Nach neueren Untersuchungen scheint zusätzlich eine dissoziierbare S-S-Komponente eine Rolle zu spielen. Seine serologische Aktivität verdankt der Rheumafaktor seiner Fähigkeit, mit Gammaglobulin zu reagieren, mit dem er Präzipitation ergibt. Diese Tatsache liegt allen Reaktionen zu seinem Nachweis zu Grunde.

Z i f f und seine Mitarbeiter [23, 13] beobachteten, daß, wenn man die Euglobulinfraktion eines Nichtrheumatikerserums zu einem genügend verdünnten bekannt positiven Rheumaserum hinzufügte, die Agglutination unterdrückt wurde. Fügten sie statt dessen jedoch die Euglobulinfraktion eines Rheumaserums zu der Verdünnungsreihe eines ebenfalls bekannt positiven Rheumatikerserums hinzu, dann wurde die nicht unterdrückt. Diese Beobachtung ließ vermuten, daß die Euglobulinfraktion aller Seren einen Agglutinations-Inhibitions-Faktor enthält. Die Euglobulinfraktion des Rheumatikerserums enthält jedoch beides, den Agglutinationsfaktor und den Inhibitionsfaktor. In der Euglobulinfraktion des Rheumatikers heben sich diese beiden Eigenschaften somit auf, sie werden neutralisiert. Fügt man eine solche Euglobulinfraktion einem bekannt positiven Rheumaserum-Agglutinations-System hinzu, so wird keine Beeinflussung der Agglutinationsfähigkeit erfolgen. Die Beobachtungen und Folgerungen von Z i f f wurden von anderen Forschern bestätigt. Z i f f [23, 13] baute darauf seinen Inhibitionstest auf und konnte mit dem Testverfahren positive Resultate bis zu 98% erzielen unter gleichzeitiger Reduzierung der falsch positiven Ergebnisse bei Nichtrheumatikerseren bis zu 4%. Leider besteht ein wesentlicher Nachteil dieses Testes in seiner technisch außerordentlich schwierigen Durchführbarkeit.

Methodik:

1. Herstellung der Euglobulinfraktion:

a) 1 bis 3 ml Serum werden inaktiviert.

b) Das inaktivierte Serum wird mit der gleichen Menge gewaschener Hammelerythrozyten (HE) versetzt und eine Stunde im Wasserbad bei 37 Grad C gehalten (Die HE werden mit eiskaltem Neutralpuffer (pH 7,0) gewaschen).

c) Das absorbierte Serum wird 10 Minuten mit 2300 Touren/Min zentrifugiert.

d) Das abzentrifugierte Serum wird mit der gleichen Menge Aqua bidest. versetzt und in einen Dialysierbeutel verbracht.

e) Dialyse des Beutels in der Kälte (+4 Grad C) gegen 6 l einer M/150-Citrat-Phophat-Pufferlösung pH 5,8 (gelegentlich umschütteln). Es sollen nicht mehr als 12 Seren zugleich dialysiert werden.

f) Das Präzipitat wird eine halbe bis eine Stunde scharf zentrifugiert und anschließend mit 1,5 ml eiskaltem Neutralpuffer gewaschen.

g) Der Bodensatz wird in einer der Ausgangsmenge des Serums entsprechenden Neutralpufferlösung aufgelöst.

2. Inhibitionstest:

a) Ambozeptor-Vorversuch: Zu 0,25 ml Kaninchenambozeptor in Verdünnungen von 1:100, 1:200, 1:300 usw. werden 0,5 ml Neutralpuffer und 0,25 ml einer 3%igen HE-Suspension hinzugefügt. Für 3/4 Stunden in den Brutschrank verbringen und dann über Nacht im Eisschrank belassen. Der Endpunkt der Agglutination wird als Basisagglutinationstiter bezeichnet. Für das weitere Testverfahren verwendet man 1/20 des Basisagglutinationstiters.

b) Das zu hemmende bekannt positive Rheumaserum wird wie folgt präpariert: 0,5 ml Serum werden doppelt in Neutralpuffer und 0,5 ml sensibilisierten HE (1/20 des Basisagglutinationstiters des Ambozeptors) verdünnt. Der Endpunkt der Agglutination wird festgehalten und 0,25 ml der Lösung, die einem Achtel dieses Endpunkttiters entspricht, dem Inhibitionstest zugegeben (d.h. die Lösung enthält acht "Einheiten" Agglutinationsaktivität). Das zu hemmende Rheumaserum muß Titer von 1:448 bis 1:1792 aufweisen. Es empfiehlt sich, stets frisches Serum des gleichen Patienten zu verwenden.

c) Inhibition: Es werden gut gesäuberte Salkplatten verwandt. Die

Euglobulinfraktion (s.o.) wird mit Neutralpuffer 1:7 verdünnt. 0,25 ml dieser verdünnten Euglobulinfraktion werden überpipettiert. Der Verdünnungsreihe werden hinzugefügt 0,25 ml hemmendes Rheumaserum (s.o.) und 0,25 ml sensibilisierte frische HE.

d) Die Verdünnungsreihen werden 3/4 Stunden in den Brutschrank verbracht und danach 12 Stunden im Kühlschrank gehalten.

3. Kontrollen:

a) Verdünnung von Euglobulinfraktion 1:5 bis 1:20 werden mit 3%iger nicht sensibilisierter HE-Suspension versetzt. Sind die Kontrollen positiv, so wurde der heterophile Antikörper nicht genügend absorbiert.

b) 0,5 ml Neutralpuffer werden mit 0,5 ml sensibilisierten HE versetzt.

4. Ablesen der Ergebnisse:

Der Inhibitionstiter wird ausgedrückt als die stärkste Verdünnung des Euglobulins, in deren Gegenwart es noch nicht zu einer Agglutination kommt. Inhibition wird als vorhanden registriert, wenn sie bei einer Euglobulinverdünnung von 1:14 festgestellt wird. Alle Ablesungen werden unter Verwendung einer Handlinse bei direktem Licht unter leichtem Schütteln der Platten vorgenommen.

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse des Inhibitionstestes im Vergleich mit den Resultaten des Latex-Fixationstestes und des Hämagglutinationstestes mit menschlichem O-Blut nach M i e h l k e und P u t t n i m s [64]. Es wurden 124 Seren geprüft, davon waren 55 Seren von Patienten mit klinisch sicherer primär chronischer Polyarthritis, und von 69 Kontrollfällen waren 26 Patienten, die an Silikose litten [64, 119]. Sie haben diese Fälle in ihrer Tabelle gesondert aufgeführt, da sie bei ihren serologischen Untersuchungen festgestellt haben, daß Silikoseseren in ganz auffallend hohem Prozentsatz positive Testergebnisse lieferten. In Zusammenarbeit mit F r i t z e und D i e c k m a n s bearbeiten sie dieses Problem zur Zeit. Ihre Vermutung, daß bei dieser Erkrankung ein dem Rheumafaktor ähnlicher Serumbestandteil vorhanden ist, scheint sich zu bestätigen.

Bei den übrigen Kontrollfällen handelt es sich neben vier Seren von Gesunden um Arthrosen, Spondylosen, zwei Fälle von akutem rheumatischen Fieber, einer Sklerodermie, sieben Fällen von

	Hämaggl.-Test (ganzes Serum)	Latex-Fix.-Test	Inhibitions-Test (Euglobulinfraktion)
Anzahl der Fälle	54	55	55
Anzahl der positiven Fälle	35 = 65%	42 = 77%	52 = 94%
Kontrollfälle			
Anzahl der Fälle	41	41	43
Anzahl der positiven Fälle	11 = 27%	11 = 27%	4 = 9,3%
Silikose			
Anzahl der Fälle	24	26	26
Anzahl der positiven Fälle	8 = 35%	10 = 38%	10 = 38%

Tabelle 1, Primär chronische Polyarthritis

Bechterew'scher Erkrankung, vier Erkrankungen an Fibrositis, einer Endokarditis und einem Lupus erythematodes um weitere nicht mit rheumatischen Leiden im Zusammenhang stehende Erkrankungen. Von diesen Kontrollfällen fielen im Inhibitionstest vier Resultate positiv aus. Es handelte sich dabei um einen Fall mit Lupus erythematodes, ein Leber-Karzinom, eine Endokarditis lenta und eine Erkrankung an rheumatischem Fieber. Von insgesamt 55 Fällen mit sicherer primär chronischer Polyarthritis ergaben drei Fälle im Inhibitionstest negative Resultate. Hiervon handelte es sich in zwei Fällen um beginnende primär chronische Polyarthritiden, die auch mit den anderen Testverfahren negativ ausgefallen waren. Der weitere Verlauf des Leidens bestätigte jedoch klinisch in diesen Fällen die Richtigkeit der Diagnose. Der Latexfixationstest fiel in beiden Fällen nach vier bzw. sechs Wochen Fortbestand des Leidens bei einer zweiten Testung positiv aus. Bei dem dritten Fall mit negativem Resultat im Inhibitionstest handelte es sich um eine Kranke, bei der eine primär chronische Polyarthritis mit starken Gelenkdeformitäten bereits seit Jahren bekannt war. Zum Zeitpunkt der serologischen Untersuchung befand sich diese Kranke jedoch im vierten Schwangerschaftsmonat. Klinisch war das Leiden dadurch wesentlich gebessert. Vor Beginn der Schwangerschaft ist leider in diesem Fall niemals auf die Anwesenheit des Rheumafaktors getestet worden. Nach dem klinischen Bild muß mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß der serologische Nachweis des Rheumafaktors zu diesem Zeitpunkt positiv ausgefallen wäre. Es ist bekannt, daß eine primär chronische Polyarthritis während einer Schwangerschaft klinisch in Remission gehen kann. M i e h l k e und P u t t n i m s kannten keine Untersuchungen, aus denen hervorgeht, ob diese Remission auch serologisch mit einer Verminderung oder einem völligen Schwinden der Agglutinationsaktivität einhergeht.

Von den 28 Fällen mit Silikose ergaben 10 Fälle im Inhibitionstest ein positives Resultat. Auch mit den anderen Testverfahren hatten M i e h l k e und P u t t n i m s positive Resultate in etwa der gleichen Größenordnung festgestellt. Es handelte sich in allen Fällen um reine Silikose ohne die beim Caplan-Syndrom bekannte Gelenkbeteiligung.

Gegenüber dem Latexfixationstest ergab der Inhibitionstest bei

sicherer primär chronischer Polyarthritis eine Steigerung von 77% auf 94,5% der positiven Ergebnisse. Gegenüber dem Hämagglutinationstest ergab sich eine Steigerung von 65% auf 94,5%. Demgegenüber zeigte sich bei den negativen Kontrollen eine Verminderung der falsch positiven Resultate von 27% beim Latexfixationstest und beim Hämagglutinationstest auf 9,3% beim Inhibitionstest. Bei den Silikose-Fällen blieben die positiven Testergebnisse bei allen drei Testverfahren etwa in gleicher Höhe.

Nachweis des Rheumafaktors mittels Streulichtmessung der Grenzschicht zwischen Patientenserum und Gammaglobulin

Im Serum von Patienten mit primär chronischen Polyarthritiden kommt in einem sehr hohen Prozentsatz eine pathologische Substanz (rheumatischer Arthritis-Serum-Faktor (RAS-Faktor)) vor, die sensibilisierte Hammelerythrozyten zur Agglutination bringt. Diese zuerst von M e y e r [51] beobachtete Reaktion zwischen Patientenserum und sensibilisierten Hammelerythrozyten, die W a a l e r als charakteristisch für die chronische Polyarthritis erkannte, wurde von R o s e und Mitarbeitern zu einem diagnostischen Test für diese Erkrankung ausgearbeitet. Mehrere Modifikationen des Verfahrens wurden beschrieben, so von H e l l e r und Mitarbeitern und S v a r t z und S c h l o s s m a n n , die eine Vereinfachung und Erhöhung der Spezifität der Methode anstreben. H e l l e r und Mitarbeiter fanden auch, daß zur Sensibilisierung der Arythrozyten ein Anti-erythrozytenserum nicht erforderlich ist, sondern daß hierzu ein normales Gammaglobulin (Cohn-Fraktion-II [23, 89]) ausreicht. Diese Beobachtung führte zu zahlreichen Studien über die mögliche gegenseitige Beeinflussung von Gammaglobulinfraktionen und Fraktionen von Seren chronischer Polyarthritiden, aus denen resultiert, daß die Agglutination sensibilisierter Erythrozyten im Serum von chronischen Polyarthritiden durch eine Aggregation des RAS-Faktors mit dem an den Erythrozyten fixierten Gammaglobulin bedingt ist. Im gleichen Sinne ist auch die Agglutination menschlicher Erythrozyten, die mit Rh-Antikörper beladen sind, im Rheumatiker-Serum zu deuten.

Um bei diagnostischen Untersuchungen von Seren auf den RAS-Faktor die Erythrozyten auszuschalten, die durch unkontrollierbare Eigenarten und Einflüsse Fehlresultate bedingt sein können, entwickelten S i n g e r und P l o t z den Latex-Bindungstest, bei dem statt sensibilisierter Erythrozyten das mit Gammaglobulin beladene, biologisch neutrale Latex verwandt wird. Die einzelnen Latex-Partikel werden bei Anwesenheit des RAS-Faktors im untersuchten Serum ähnlich wie sensibilisierte Erythrozyten durch eine Reaktion zwischen RAS-Faktor und Gammaglobulin agglutiniert. E p s t e i n und Mitarbeiter [51] fanden, daß unter gewissen Bedingungen auch eine direkte

Präzipitationsreaktion zwischen Seren von Patienten mit chronischen Polyarthritiden und einer Präparation menschlichen Gammaglobulins beobachtet werden kann. Obwohl auch diese Methode die Verwendung von Erythrozyten ausschaltet, ist sie für Routineuntersuchungen aus technischen Gründen kaum brauchbar [51]. Die Untersuchungen von E p s t e i n und Mitarbeitern [51] zeigen aber, daß im Prinzip die Reaktion zwischen RAS-Faktor und Gammaglobulin auch ohne Zuhilfenahme eines Gammaglobulinträgers sichtbar gemacht werden kann. Um die Reaktion ohne vorherige Fraktionierung des Patientenserums in einem kürzeren Zeitraum evtl. auch quantitativ zu erfassen, haben K l e i n e , M ü l l e r und M a t t h e s [51] die objektive Messung der Grenzschichtreaktion zwischen Patientenserum und Gammaglobulin mit Hilfe eines speziellen Gerätes in einfacher Methodik herangezogen, ähnlich wie sie zur Erkennung von Toxin-Antitoxinreaktionen von ihnen benutzt wurde.

Methodik (Grenzschichtreaktion [51]):

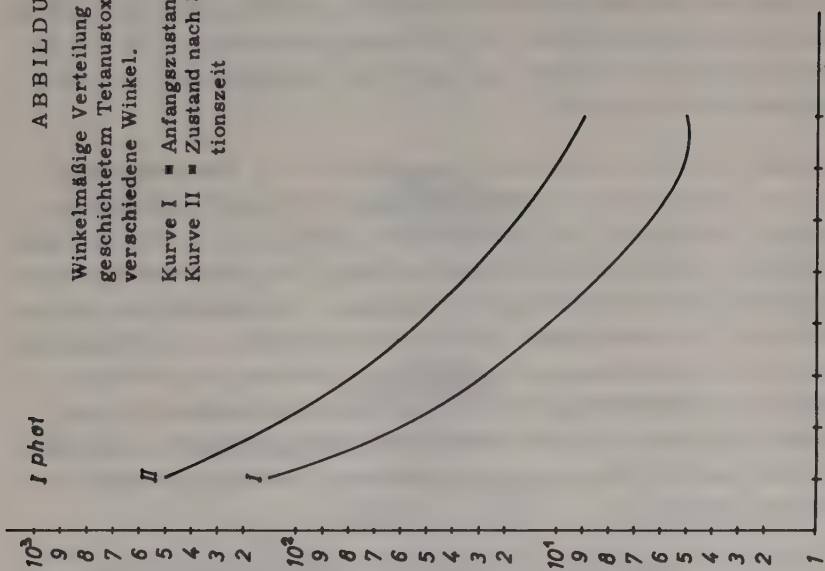
Zur objektiven Verfolgung der Bindung zwischen Gammaglobulin und RAS-Faktor der Patientenseren wurde das Überschichtungsverfahren gewählt, um nicht in starkem Maße auf Grund eventueller Hemmungszonen von der jeweiligen Konzentration der Reaktanten abhängig zu sein. Fällt Licht durch die Grenzschicht der Lösungen von Gammaglobulin und Patientenseren, so muß bei Aggregatbildung eine Änderung der Lichtablenkung gegenüber dem Anfangsstadium eintreten, die in einer einfachen Meßanordnung zur Bestimmung der Größe und Geschwindigkeit der Grenzschichtreaktion ausgenutzt werden kann.

Zur Ermittlung der Streuwinkel, unter denen die größte relative Änderung des Streulichtes im Verlauf einer Grenzschichtreaktion eintritt, wurden orientierende Messungen im vertikalen Strahlengang durchgeführt. Als Modellsystem wurde Tetanustoxin-Antitoxin angewendet, das innerhalb einer Stunde bei Zimmertemperatur keine sichtbare Präzipitation ergibt. Dabei wurde das im Verhältnis 1:8 verdünnte Antitoxin über das unverdünnte Toxin geschichtet. Der unter den verschiedenen Winkeln abgelenkte Lichtstrom wurde mit einer photoelektrischen Einrichtung quantitativ bestimmt. In Abbildung 1 sind die mit dem Modellsystem gemessenen Lichtverteilungskurven dargestellt, wobei der dem Lichtstrom entsprechende Photostrom logarithmisch in Abhängigkeit von dem Ablenkungswinkel aufgetragen

ABBILDUNG 1

Winkelmäßige Verteilung des Streulichtes von geschichtetem Tetanustoxin-Antitoxin über verschiedene Winkel.

Kurve I = Anfangszustand
Kurve II = Zustand nach 30 Minuten Reaktionszeit



ist. Die Werte der Kurve I wurden sofort nach Überschichtung gemessen, die der Kurve II nach einer Reaktionszeit von 30 Minuten.

Auf Grund der Lichtverteilungskurven konnte ausgesagt werden, daß die auftretende relative Lichtstromänderung bei dieser Grenzschichtreaktion etwa unter dem Winkel von 45 Grad am größten ist, während die kleineren Ablenkungswinkel den größten Streulichtanteil enthalten. Nach diesen Befunden wurde ein Meßgerät konstruiert, in dem als Kompromiß zwischen größter Photostromausbeute und stärkster Photostromänderung im Verlauf einer Grenzschichtreaktion die Ablenkungswinkel von 10 Grad bis 45 Grad zur Messung ausgenutzt wurden.

Der Aufbau des Gerätes ist in Abbildung 2 dargestellt. Die Linse D bildet die durch die Lichtquelle A und den Kondensor B ausgeleuchtete Blende C in der Ebene des Photoelementes J ab. Die Lichtquelle wird während der Messungen auf konstanter Spannung gehalten. Solange sich kein streuendes Medium im Strahlengang befindet, fällt das gesamte Licht in die zentrale Bohrung H des Photoelementes, so daß kein Photostrom entsteht.

Wird nun die Küvette F mit der Grenzschicht G – das Deckglas E dient zur Vermeidung der Meniskenbildung – in den Strahlengang gebracht, so erfolgt eine Streuung des Lichtes, die zur Beleuchtung der aktiven Fläche des Photoelementes führt. Der entstehende Photostrom wird mit einem Galvanometer gemessen. Das Meßgerät ist so eingerichtet, daß nacheinander 10 verschiedene Küvetten ohne Erschütterung in den Strahlengang geschwenkt werden können. Die zeitliche Konstanz der Meßanordnung wird durch einen Streustandard, der an Stelle einer Küvette in den Strahlengang gebracht werden kann, kontrolliert und der Photostrom gegebenenfalls durch eine Regelvorrichtung korrigiert.

Die für die Grenzschichtreaktion vorbereiteten Lösungen werden vor der Schichtung mit einer Wasserstrahlpumpe entgast, um spätere Blasenbildung in den Küvetten zu vermeiden. In die Küvetten, deren Fassungsvermögen ungefähr 0,8 ml beträgt, wird zunächst die jeweils leichtere Lösung eingefüllt und dann mit Hilfe einer Vollpipette die schwerere unterschichtet. Eine flache Kuppe über dem Küvettenrand wird mit dem Deckglas weggeschoben und dieses auf den planpolierten Küvettenrand gedrückt, um einen luftdichten Abschluß zu

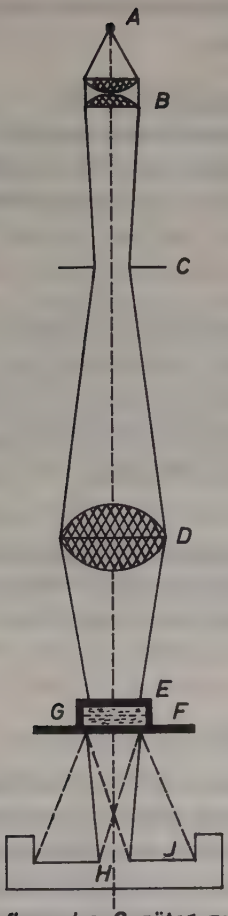


Abb.2 Aufbau des Gerätes zur objek-tiven Messung von Grenzschichtreaktion

erzielen. Der Beginn des Unterschichtens wird als Zeitpunkt t = 0 festgesetzt. Die erste Meßwertablesung erfolgt nach einer Minute, alle späteren Ablesungen werden auf diesen ersten Wert bezogen. Die Messungen finden bei Zimmertemperatur statt.

Zur Untersuchung von Patientenseren auf den RAS-Faktor wurden folgende Stammlösungen angesetzt:

Borat-Kochsalzpuffer (pH = 8,0):
50 ml einer 0,1 mol Borsäurelösung und 5,9 ml einer 0,1 n NaOH-Lösung werden mit aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt und der pH-Wert auf 8,0 eingestellt. In je 100 ml Pufferlösung werden dann 0,85 g NaCl aufgelöst.

Gamma-Globulin:
Diese kann aus lyophilisiertem oder konzentriert gelöstem Gamma-Globulin (Cohn-Fraktion-II, hergestellt aus einer Mischung verschiedener Spenderseren) angesetzt werden, indem als Auflösungs- oder Verdünnungsmittel der Borat-Kochsalzpuffer verwandt wird. Die Endkonzentration soll 0,5 g Gamma-Globulin in 100 ml Borat-Kochsalzpufferlösung betragen.

Bei den zu den Untersuchungen herangezogenen Patientenseren wurde die Hämagglutinationsreaktion nach W a a l e r - R o s e in der Modifikation von S v a r t z und S c h l o s s m a n n vergleichend bestimmt.

Untersuchungsergebnisse

Um festzustellen, inwieweit mit der oben beschriebenen Meßanordnung eine Reaktion zwischen RAS-Faktor und Gamma-Globulin erfaßt werden kann und welche Faktoren den Reaktionsablauf beeinflussen, wurde zunächst das Serum eines Patienten mit primär chronischer Polyarthritis verschiedenen, mit Boratkochsalzpuffer hergestellten Verdünnungen untersucht und die zeitliche Abhängigkeit der Meßwerte aufgenommen (Nach K l e i n e , M ü l l e r und M a t t h e s [51]). Bei dieser Messung wurde eine 0,5%ige Gamma-Globulinlösung für die Überschichtung verwendet. Der Titer der W a a l e r - R o s e ' schen Hämagglutinationsreaktion betrug in dem benutzten Patientenserum 1:256.

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, daß mittels der Grenzschichtuntersuchung eine Reaktion zwischen dem Patientenserum und dem Gamma-Globulin erfaßt werden kann, die bei Verwendung von Normalserum oder bei Benutzung einer Borat-Kochsalzpufferlösung an Stelle der Gamma-Globulin-Lösung nicht auftritt. Der Grad der Lichtablenkung durch die Reaktion läßt eine Beziehung zur verwendeten Serumkonzentration erkennen.

In Abbildung 3 ist die prozentuale Änderung der Meßwerte nach 90 Minuten Reaktionsdauer gegenüber den Werten bei t = 0 in Abhängigkeit von der Serumkonzentration aufgetragen. Hieraus kann abgelesen werden, daß der Meßwertanstieg bei kleiner Serumkozentration (Verdünnung von 1:16 u.m.) proportional der Serumkonzentration und somit wohl auch der Konzentration des RAS-Faktors verläuft. Mit zunehmender Konzentration werden die Meßwertanstiege wieder geringer und erreichen schließlich bei 1:4 schon fast einen Sättigungswert. Diese Darstellung zeigt also zwei Kurven, die sich in der Nähe einer Serumverdünnung von 1:16 in einem scharfen Maximum schneiden, und deren eine als Gerade die proportionale Abhängigkeit des Meßwertes von der Konzentration ergibt. Die geringeren Meßwertanstiege bei höheren Serumkonzentrationen sind wahrscheinlich damit zu erklären, daß bei diesen innerhalb der Grenzschicht Hemmungszonen auftreten, die eine optimale Aggregation von RAS-Faktor und Gamma-Globulin zu Komplexen verhindern. Um also in einem Meßvorgang quantitative Aussagen über den RAS-Faktor machen zu können, empfiehlt es sich, die Serumkonzentration kleiner oder gleich 1:16 zu wählen.

Die typische zeitliche Abhängigkeit der Meßwerte bei einer Serumverdünnung von 1:16 ist aus Abbildung 4 ersichtlich. Da die Kurve bereits nach 90 Minuten in einen Sättigungsverlauf übergeht und bei dieser Zeit damit eine proportionale Abhängigkeit des Meßwertanstieges vom Titer des Serums gewährleistet erscheint, dürfte es zweckmäßig sein, für Routineuntersuchungen neben dem 1-Minutenwert den 90-Minutenwert abzulesen.

Zur Ermittlung der günstigsten Gamma-Globulinkonzentration wurden Meßreihen durchgeführt, bei denen das Serum stets in gleichem Verhältnis (1:16) verdünnt war und nur die Konzentration des Gamma-Globulins varriert wurde. Das Ergebnis nach einer Reaktionsdauer

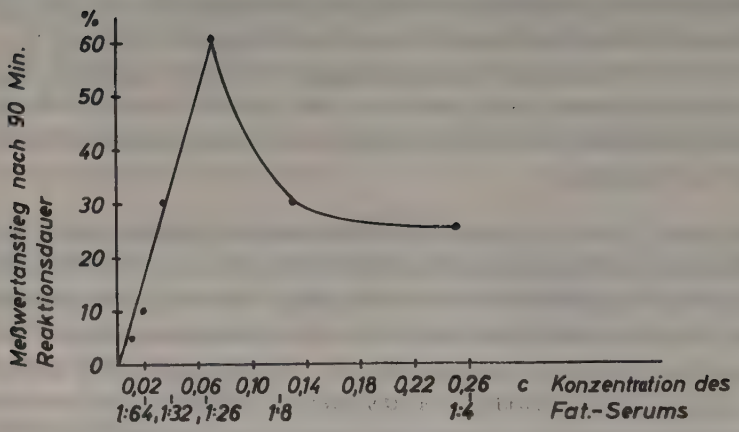


ABBILDUNG 3

Abhängigkeit des Meßwertanstieges von der Serumkonzentration nach 90 Min. Reaktionsdauer und bei jeweiliger Gamma-Globulinkonzentration von 0, 5 % bei Verwendung eines Patientenserums mit einem WAALER-ROSEschen Hämagglutinationstiter von 1 : 256.

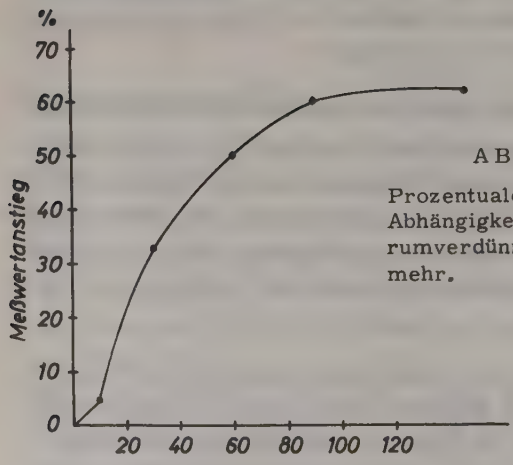


ABBILDUNG 4

Prozentuale Meßwertzunahme in Abhängigkeit von der Zeit bei Serumverdünnungen von 1 : 16 und mehr.

von 90 Minuten ist in Abbildung 5 dargestellt. Wie aus dieser Abbildung ersichtlich, ist auch hier ein deutliches Maximum vorhanden, so daß die Verwendung einer 0,5%igen Gamma-Globulinlösung für die Untersuchung optimal zu sein scheint.

Die pH-Abhängigkeit der Grenzschichtreaktion geht aus Abbildung 6 hervor. Bei diesen Messungen wurde eine konstante Patientenserumverdünnung von 1:16 und eine 0,5%ige Gamma-Globulinlösung verwendet und die Reaktion nach jeweils 90 Minuten abgelesen. Das scharf ausgeprägte Maximum des Meßwertanstieges um den pH-Wert von 6,6 ist auf eine unspezifische Reaktion im isoelektrischen Punkt der Gamma-Globuline zurückzuführen, wogegen der flache Bereich um einen pH-Wert von 8,0 tatsächlich der Reaktion zwischen Patientenserum und Gamma-Globulin zugeordnet werden kann, da in diesem Bereich die Kontrollmessungen stets negativ verliefen.

Wie weiter festgestellt werden konnte, ist die Reaktion sowohl mit frischem, unvorbehandeltem wie auch mit inaktiviertem Patientenserum durchführbar. Auch bei Aufbewahrung des Serums über 2 Wochen bei 4 Grad C löst die Reaktion einen annähernd gleichen Meßwertanstieg aus, wie er bei Verwendung des Frischserums erzielt wurde. Bei länger gelagerten Seren kann jedoch eine gewisse Labilität gegen die Pufferlösung auftreten. Daher ist unbedingt eine Kontrolle gegen Puffer ohne Gamma-Globulingehalt zu empfehlen und ihr 90-Minutenmeßwert-Anstieg vom Meßwertanstieg des Testes in Abzug zu bringen.

Durch vorherigen Zusatz von Gamma-Globulin zum Patientenserum wird die Reaktion gehemmt, was wahrscheinlich auf eine Bindung des RAS-Faktors durch das Gamma-Globulin zu beziehen ist.

Auf Grund dieser Ergebnisse kann man also optimale Bedingungen für die Grenzschichtreaktion zur Erkennung des RAS-Faktors im Serum folgendes angeben:

1. Verwendung von relativ ffischem Patientenserum in einer Verdünnung von 1:16 mit Borat-Kochsalzpuffer bei pH 8,0;
2. Schichtung mit 5%iger Gamma-Globulinlösung mit einem pH Wert von 8,0;
3. Ablesung der Meßwerte 1 Minute und 90 Minuten nach Schichtungsbeginn.

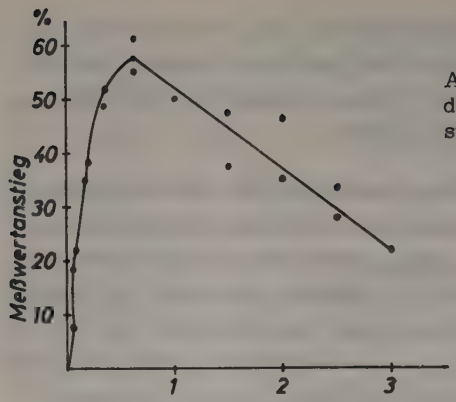


ABBILDUNG 5

Abhängigkeit der Meßwertanstiege von der Gamma-Globulinkonzentration bei stets gleicher Serumverdünnung (1 : 16).

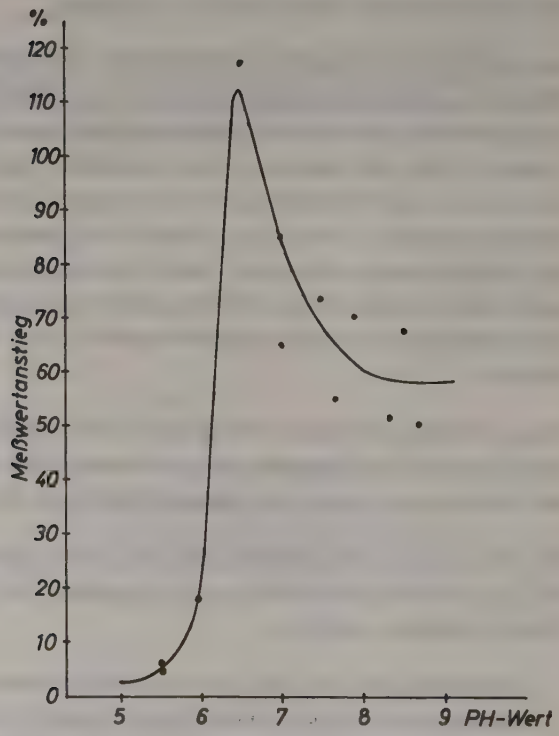


ABBILDUNG 6

Abhängigkeit der Meßwertanstiege vom pH-Wert der geschichteten Lösungen (Serum 1 : 16 verdünnt, Gamma-Globulinlösung 0, 5 %ig).

Die oben erwähnten Untersuchungen beweisen, daß eine Reaktion zwischen dem Gamma-Globulin und dem RAS-Faktor auftritt, die in der Grenzschicht nach ca. 90 Minuten annähernd vollständig abgelaufen ist und photoelektrisch erfaßt werden kann. Sichtbare Präzipitationen treten bei dieser Reaktion unter Verwendung von Nativserum nicht auf, wie auch die Versuche von K l e i n e , M ü l l e r und M a t t h e s [51] mit Patientenserum, die einen hohen W a a l e r - R o s e 'schen Hämagglutinationstiter (bis 1:1024) aufwiesen, und Gamma-Globulin im Agardiffusionstest nach O u c h t e r - L o n y [51] ergaben. Immunoelektrophoretische Untersuchungen mit der von S c h e i d e g g e r modifizierten Methode nach G r a b a r [51], bei der das Patientenserum elektrophoretisch aufgetrennt und eine 0,5%ige Gamma-Globulinlösung an Stelle eines Antikörpers von einem Seitenkanal durch Diffusion an das aufgetrennte Serum herangebracht wurde, ließen ebenfalls keine Präzipitation erkennen.

Die von K l e i n e , M ü l l e r und M a t t h e s [51] bisher durchgeführten Untersuchungen an 10 Seren von primär chronischen Polyarthritiden mit einem W a a l e r - R o s e 'schen Hämagglutinationstiter von 1:32 und mehr ergaben bei der Grenzschichtmessung einen Meßwertanstieg, der gewisse Beziehungen zu der Titerhöhe der Hämagglutinationsreaktion nach W a a l e r und R o s e aufwies, ohne das allerdings bis jetzt eine exakte Parallelität zwischen den beiden Größen ermittelt werden konnte. Hierfür sind Untersuchungen an einem größeren Zahlenmaterial erforderlich. 20 Seren mit Titerwerten unter 1:16 ergaben keinen Meßwertanstieg, auch bei einem Titer von 1:16 waren die Meßwertänderungen in 6 untersuchten Fällen nicht signifikant. 2 Seren mit einem Hämagglutinationstiter von 1:32 ergaben dagegen schon deutliche Meßwertanstiege. Es muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, diese Ergebnisse zu unterbauen.

Bentonit-Flockungstest (B.F.T.)

Alle in der Klinik verwendeten Methoden zum Nachweis des sog. Rheumafaktors der primär chronischen Polyarthritis basieren auf einer Reaktion zwischen einem Gamma-Globulin und dem Anti-Gamma-Globulin (= Rheumafaktor). Um diese Reaktion sichtbar zu machen, werden als Trägermedien Erythrozyten (sog. W a a l e r - R o s e - Reaktion) oder hochmolekulare Substanzen wie Kollodium, Latex und auch Bentonit verwendet. In positiven Fällen ist das Ergebnis eine makroskopisch sichtbare Agglutination.

Wie der Latex-Fixationstest ist auch der Bentonit-Flocculationstest ein ebenso schnelles und empfindliches wie einfaches serologisches Verfahren. Das methodische Prinzip des Bentonit-Tests wurde ursprünglich 1951 von B o z i c e v i c h und Mitarbeitern für die Trichinose entwickelt. Für die Rheumadiagnostik ist es von B o z i c e v i c h , B u m i n , F r e u n d und W a r d [60] angegeben. Bei Vergleich mit der W a a l e r - R o s e -Reaktion ergeben sich in 98% der Fälle Übereinstimmungen.

Im Prinzip wird eine Gamma-Globulin-Fraktion II (nach Cohn) an Bentonitpartikel absorbiert, die Reaktion (Agglutination) ist bei Anwesenheit des Rheumafaktors (in 85% der Fälle bei primär chronischer Polyarthritis, in 50% aber auch bei Lupus erythematodes disseminatus, häufig auch bei Sklerodermie) positiv. In 3% aller Kontrollfälle wies der Bentonittest falsch positive Ergebnisse auf.

Von den zu untersuchenden Seren kann eine Veränderungsreihe hergestellt und damit ein entsprechender Serumtiter ermittelt werden.

Nun wurde von B l o c h und B u m i n [120] ähnlich wie bei der Latextechnik auch für die Bentonit-Methode ein Schnelltest angegeben. Für diesen Test ist auf einem Objektträger 1 Tropfen einer Bentonit-Gamma-Globulin-Suspension, wobei das Gamma-Globulin vor Adsorption 10 Minuten bei 63 Grad C erhitzt wird, mit 1 Tropfen unverdünntem, inaktiviertem (30 Minuten bei 56 Grad C) Serum auf einen Objektträger zusammenzugeben und auf Agglutination bzw. "Flockung" nach 3 bis 5 Minuten zu prüfen. Dieser Objektträger-Schnelltest stimmt in 89,2% der Fälle mit der Bentonit-Flocculations-

reaktion im Reagensglas überein. Die Beladung des Bentonit mit Gamma-Globulin, die durch 30 minutiges Stehen eines Bentonitsedimentes + Gamma-Globulin bzw. mit Fraktion II erfolgt (anschließend Zentrifugation und 1- bis 2-maliges Waschen), ist eventuell im einzelnen in einer der angegebenen Publikationen nachzulesen [60, 120, 121].

Man kann sich diese Arbeit ersparen, wenn an Stelle der Bentonit-Flocculation der weit häufiger angewendete prinzipiell gleiche Latexfixationstest vorgenommen wird, von dem ein Besteck mit einer Latex-Gamma-Globulin-Suspension sowie positive und negative Kontrollseren im Handel sind (Behring-Werke und Hämoderivate Wien). Eine entsprechende Anweisung für diese Reaktion ist beigegeben [121].

Der Latex-Fixationstest

Die Entdeckung des hier beschriebenen Latex-Fixationstestes durch Singer und Plotz [5] bedeutete einen wesentlichen Fortschritt in der Diagnosestellung der primär chronischen Polyarthritis. Der Test hat Ähnlichkeit mit dem bisher verwandten Hämagglutinationstest. An Stelle von sensibilisierten Hammelblutkörperchen werden fast gleich große Teilchen eines synthetischen Stoffes benutzt. Wenn auch der Hämagglutinationstest von Waaler-Rose [122, 3], insbesondere in der Modifikation von Heller sowie Svartz und Schlossmann [123] von den Autoren als spezifische und für die Praxis brauchbare Methode angesehen wird, so ist sein Wert als Routinemethode nicht überzeugend. Die Ergebnisse schwanken laut größeren zusammenfassenden Statistiken [124]. Die Reaktion wird nach Ansicht der meisten Autoren erst zum Zeitpunkt deutlicher Krankheitsmanifestation positiv [118], wodurch der praktische Wert eingeschränkt wird, da gerade bei fraglichen und bei Frühfällen ein konkreter Anhaltspunkt wichtig wäre. In diesem Sinne scheint der Latex-Fixationstest überlegen zu sein.

Bei vergleichenden Untersuchungen mit beiden Testen erhielten Braunsteiner, Egghart, Reinhardt und Wiedermann mit dem Latex-Fixationstest bessere Resultate [125]. Die beim Hämagglutinationstest fraglichen Fälle, das sind die mit einem niedrigen Titer, fallen beim Latex-Fixationstest weg, da mit diesem die Resultate immer eindeutig sind. Weitere Vorzüge des Latex-Fixationstestes sind seine Einfachheit und die rasche Durchführbarkeit.

Braunsteiner, Egghart, Reinhardt und Wiedermann [127] führten zunächst den Latex-Fixationstest in der von Singer und Plotz [5] beschriebenen Weise mit einer geringen Modifikation in der Ablesung durch. Dieser Test ist dem Erythrozytenagglutinationstest ähnlich, nur werden statt der sensibiliserten Hammelblutkörperchen Poly-

styrene-Latexpartikelchen, das Ausgangsmaterial zur Gummierzeugung, mit einem einheitlichen Durchmesser von 0,81 Millimikron verwendet, wodurch eine wesentliche Vereinfachung und die Ausschaltung unübersehbarer Faktoren durch die Verwendung eines synthetischen Stoffes erreicht wird. Im Prinzip setzt man einer Verdünnungsreihe von Rheumatikerserum eine Latex-Fixationslösung zu, deren einzelne Partikelchen unter bestimmten Bedingungen mit Gammaglobulin beladen wurde, läßt inkubieren, zentrifugieren und beurteilt dann die Präzipitation. Singer und Plotz beurteilen diese sofort nach dem Zentrifugieren. Nach Erfahrung von Braunsteiner, Egghart, Reinhardt und Wiedermann erscheint es angezeigt, die Röhrchen noch 24 bis 48 Stunden stehen zu lassen und dann abzulesen, da bis zu diesem Zeitpunkt einzelne Proben bis zu höheren Verdünnungen nach präzipitieren können, beziehungsweise gar nicht so selten vorher negative Proben ein positives Ergebnis zeigen. Es findet sich häufig nach dem Stehenlassen der Röhrchen bis zu 24 Stunden nach dem Zentrifugieren ein falsch positives Ergebnis.

Miehlke, Kruppa und Schimanski [126, 129] arbeiten seit ca. 2 Jahren mit der verbesserten Latex-Charge der DOW Chemical Lot. Nr. LS-424-E, die sensitiver ist als die bisher verwandten Latex-Suspensionen. Die Beladung erfolgt mit Gamma-Globulin-Fraktion II. Eine Vorratslösung wird hergestellt, indem man 1 g Gammaglobulin mit 100 ml Glykokoll-Puffer löst. Falls die Lösung zuwenig reaktiv ist, kann eine Verbesserung dadurch erreicht werden, daß man die Gamma-Globulin-Lösung für 10 Minuten in ein Wasserbad von 63 Grad C verbringt. Als Puffer wurde Glykokoll-Puffer von pH 8,2 verwendet.

Methode (nach Singer und Plotz [126]):

1. Es werden Verdünnungsreihen des Testserums mit Glykokoll-Puffer in der Verdünnung von 1:20 bis 1:5120 hergestellt.
2. Jeder Testreihe wird als 10. Röhrchen eine Kontrolle ohne hinzugefügtes Serum beigegeben.
3. Jedem Röhrchen der Verdünnungsreihe wird dann 1 ml einer Mischung

hinzugegeben, die in Glykokoll-Puffer 1% Latex-Suspension und 5% der Gamma-Globulin-Vorratslösung enthält.

4. Die Röhrchen werden dann nach Umschütteln für 1 1/2 Stunden in ein Wasserbad von 56 Grad C verbracht, danach 3 Minuten bei 2300 rpm zentrifugiert und dann nach Aufschütteln wird die Agglutination abgelesen.
5. Agglutinationen von 1:20 und größer werden als positiv betrachtet. Eine Kontrollablesung kann nach 18stündigem Halten des Testsystems im Kühlschrank erfolgen. Hiernach wird dann ein Titer von 1:160 oder größer als positiv betrachtet.

Braunsteiner und Mitarbeiter [127] führten bisher diesen modifizierten Latex-Fixationstest bei 429 Patienten durch. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigt die folgende Tabelle.

Diagnose	Anzahl der Fälle	positiv	negativ
Primär chron. Polyarthritis	184	170	14
Akute Polyarthritis	5	0	5
Infektarthritis	12	0	12
Morbus Still	5	0	5
Arthropathia psoriatica	3	0	3
Morbus Bechterew	5	0	5
Arthrosen, Periarthritiden, Myalgien, Neuritiden	136	1	135
Lupus erythematodes	8	2	6
Cirrhosis hepatis	40	4	36
Plasmocytom	3	0	3
Makroglobulinämie	1	0	1
Kontrollfälle	27	0	27

In der Folge verwendeten Braunsteiner, Egghart, Keinhardt, Wiedermann [127] diesen Test zur Differenzierung klinisch fraglicher Fälle. Die Früherfassung primär chronischer Polyarthritiden erscheint ihnen wesentlich, da die Erfahrung gezeigt hat, daß eine Hormondauerbehandlung, wobei in der Regel kleine Dosen wie 5 bis 10 mg eines Prednisolonpräparates genügen, oft imstande ist, den Ablauf der

Erkrankung aufzuhalten. Unter dieser Fragestellung erscheint Braunsteiner und Mitarbeitern der Test brauchbar, da sie ihn wiederholt schon innerhalb der ersten Monate der Erkrankung positiv fanden.

Nun zur Frage der latex-negativen Polyarthritiden. Es sind dies im Material von Braunsteiner, Egghart, Reinhardt und Wiedermann 7% (bei Singer 28%). Sie fanden keinen Zusammenhang mit der Dauer der Erkrankung, dem Stadium, der Aktivität, mit der Behandlung oder sonstigen Tatsachen. Ursächlich kommen zwei Möglichkeiten in Betracht. Entweder fehlt der "Rheumafaktor" zumindest in aktiver Form oder es liegen Hemmkörper vor. Sie versuchten wiederholt durch Mischung des fraglichen Serums mit einem latex-positiven den Nachweis freier Hemmkörper zu erbringen, wobei bei deren Vorhandensein eine entsprechende Titersenkung auftreten müßte. Diese konnte nie nachgewiesen werden. Die Möglichkeit, daß in solchen Fällen der Rheumafaktor zwar vorhanden, jedoch seine Konzentration so gering ist, daß er durch das übliche Verdünnungsverhältnis nicht bewertet wird, versuchten sie durch eine Anreicherung der entsprechenden Serumfraktionen und anschließende Testung zu klären. Die beste Anreicherung erzielten sie durch eine präparative Elektrophorese. Während sie bei latex-positiven Seren mit den elektrophoretisch angereicherten Fraktionen eine hundertfache Titersteigerung erzielen konnten, blieb der Latex-Fixationstest bei den ursprünglich latex-negativen auch nach diesem Vorgehen negativ. Bei Seren mit einem niedrigen Titer fanden sich nach Anreicherung dem Stammtiter korrelate Werte.

Die mit der Gelenkflüssigkeit von Rheumatikern durchgeführten Latex-Fixationsteste waren positiv, vorausgesetzt, daß auch in deren Seren eine Aktivität nachweisbar war. Hingegen fiel der Test mit mazerierten Rheumaknötchen negativ aus. Deshalb erscheint Braunsteiner, Egghart, Reinhardt und Wiedermann [127, 128] die Bedeutung des "Rheumafaktors" in ätiologischer Hinsicht fraglich. Er könnte sekundär entstehen und sein Nachweis wäre demnach eine serologische Begleitreaktion. Ausschlaggebend für den positiven Ausfall ist die Anwesenheit eines Makroglobulins, das für die primär chronische

Polyarthritis weitgehend spezifisch ist, in ähnlicher Form jedoch auch zuweilen beim Lupus erythematodes disseminatus und Lebercirrhose zu finden ist.

Der Latex-Tropfentest (Rheumatoid-Arthritis-Test)

Der "Rheumafaktor" (RF) [1], von Waaler ursprünglich wegen seiner agglutinierenden Wirkung auf sensibilisierte Erythrozyten als "Agglutinations-Aktivierungsfaktor" bezeichnet, hat in letzter Zeit eine zunehmende Bedeutung bei der Erkennung und Abgrenzung der chronischen Polyarthritis von klinisch ähnlichen Krankheitsbildern gewonnen. Während die von Waaler und Rose entwickelte [66, 35] Hämagglutinations-Reaktion zum Nachweis des Rheumafaktors noch mit einer relativ großen Fehlerbreite belastet war, haben Modifikationen dieser Methode von Ball [73], Heller [71, 37, 39] sowie Svartz und Schlossmann [74, 85, 92] den Nachweis spezifischer gestaltet. In neuerer Zeit sind weitere Nachweisverfahren entwickelt worden, unter denen insbesondere der von Singer und Plotz [126] angegebene Latex-Fixationstest wegen seiner weitgehenden Spezifität stärkere Beachtung gefunden hat. Die Durchführung dieses Testes erfordert jedoch neben serologischer Erfahrung noch einen größeren Arbeitsaufwand und ist deshalb vielerorts nicht möglich. Infolgedessen richtet sich heute das Interesse mehr auf Methoden, mit denen in der Praxis der RF zur qualitativen Bestimmung des RF herangezogen werden, zeichnet sich der Latex-Tropfentest (RA-Test) durch seine Einfachheit aus. Bei diesem Test handelt es sich um eine Modifikation des Latex-Fixationstestes, bei der ein kommerziell hergestelltes Reagens, bestehend aus Latexsuspension, die mit Gamma-Globulin versetzt ist, für den Nachweis des RF benutzt wird.

Methodik (Rheins und McCoy [129]):

Bei diesem Test handelt es sich um eine Schnellmethode zum Nachweis des "Agglutination Avtivating Factor", der im Serum von Patienten, die an rheumatischer Arthritis leiden, in einem hohen Prozentsatz (92-98%) vorkommt [32].

Das Reagens für diesen Test enthält Partikel von polymerisierten ungesättigten Kohlenwasserstoffen. An diese Partikel einer be-

stimmten Größe wird Gamma-Globulin adsorbiert. Außer dem eigentlichen Reagens enthält die Packung (Serum-Institut Dr. Hans Molter, Heidelberg) eine Flasche Boratpuffer zur Verdünnung des untersuchenden Serums (1 Tropfen Serum / 1 ml Boratpuffer) und je ein Fläschchen positives und negatives Kontrollserum in verwendungsfähiger Verdünnung.

1. Verdünnung des zu untersuchenden Serums in Boratpuffer 1:20 (1 Tropfen Serum / 1 ml Boratpuffer oder 2 Tropfen Vollblut / 1 ml Boratpuffer).

2. Auf einen sauberen Objektträger werden nebeneinander je 1 Tropfen Serumverdünnung und Reagens gebracht. Die beiden Tropfen werden miteinander vermischt und über eine oval begrenzte Fläche von ca. 2 x 3 cm Durchmesser ausgestrichen und gegen einen dunklen Untergrund bei leicht rotierender Bewegung des Objektträgers 2 Minuten lang beobachtet.

3. Mit dem positiven und dem negativen Kontrollserum wird in der gleichen Weise verfahren, jedoch liegen jene bereits in einer Verdünnung von 1:20 vor und können unverändert direkt auf den Objektträger aufgetropft werden.

Bei positiver Reaktion läßt sich innerhalb der ersten Minute, oft schon nach wenigen Sekunden, mit freiem Auge eine zunehmende Agglutination feststellen.

Bei schwach positiver Reaktion tritt die Agglutination später und schwächer ein.

In negativen Fällen bleibt die Suspension völlig homogen.

Bei Gesunden werden in 3 bis 4% der Fälle positive, jedoch meist schwach positive Reaktionen beobachtet.

Je nach der Stärke der Agglutination der Latexpartikel wurde das Ergebnis der Reaktion mit 0 bis ++ bezeichnet. In Abbildung 1 haben M ü l l e r und S c h u p p [130] die verschiedenen Grade der Agglutination der Latexpartikel dargestellt.

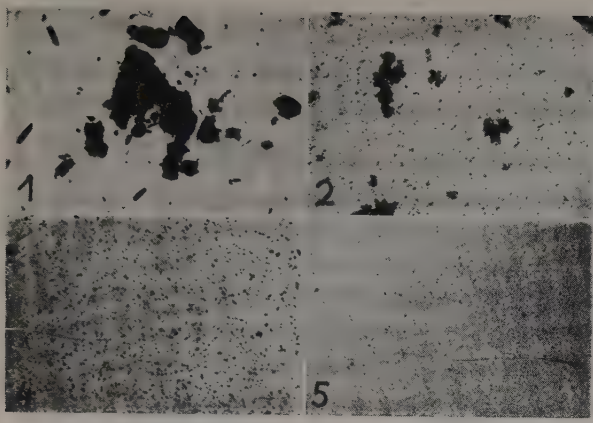


Abb. 1 a. Makroskopisch

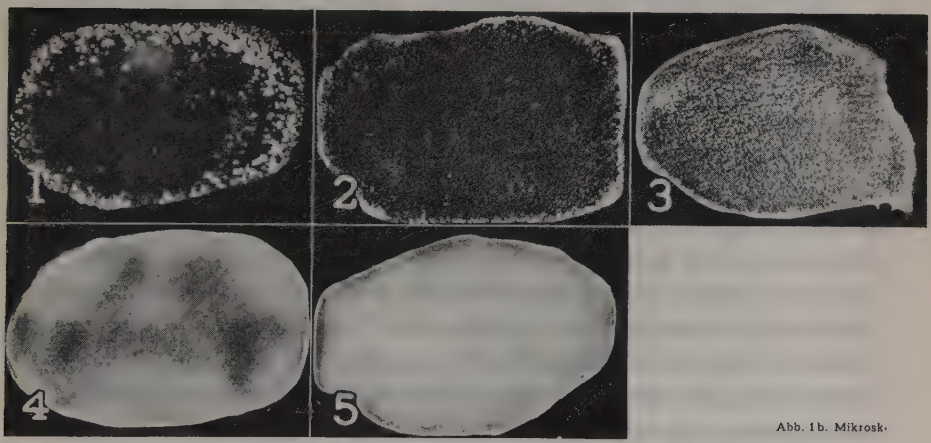


Abb. 1 b. Mikrosk.

Abb. 1. Verschiedene Agglutinations-Grade im LTT bei Verwendung verschiedener Patienten-Seren

1 = ++, 2 = +, 3 = (+), 4 = ±, 5 = negativ

Die Streptokokken-Agglutinationen

Die ersten, die ein Streptokokken-Agglutinationsverfahren in die Routinediagnostik einführten, waren Cecil, Nicholls und Stainsby (1929/30). Aus dem Blut und der Gelenkflüssigkeit von Kranken mit chronischer Polyarthritis konnten sie in ziemlich hohem Prozentsatz Alpha-hämolysierende Streptokokken züchten [131, 132]. Von diesen Stämmen erwiesen sich 38,3% als kulturell übereinstimmend und erhielten die Bezeichnung "typische Stämme". Auch serologisch waren sie gleichartig, wie Kreuzagglutinationen mit Kaninchenimmunseren ergaben [133]. Da diese Stämme heute nicht mehr verfügbar sind, dürfte es schwer sein, sie nachträglich noch zu klssifizieren. Auch Clawson, Wetherby, Hilbert und Hilleboe [134], Gray und Gowen [135] und später nochmals Nicholls und Stainsby [136] verwendeten "vergrünende Streptokokken" für die Agglutinationsteste. Erstere arbeiteten mit zwei Stämmen, die von einem Patienten mit rheumatischem Fieber bzw. mit chronischer Polyarthritis isoliert wurden und die beide die Blutplatte vergrünten. Diese Agglutinationsmethoden wurden jedoch bald verlassen. Schon Nicholls und Stainsby [133] versuchten, auch Beta-hämolysierende Streptokokken zu benutzen, ohne davon jedoch einen rechten Erfolg zu sehen. Zwei ihrer Stämme stammten von Scharlach- bzw. Erysipelkranken und ergaben etwa die gleichen Ergebnisse wie mit den "typischen Stämmen", andere Beta-hämolysierende Streptokokken versagten jedoch bei diesen Untersuchungen.

Dawson, Olmstead und Boots [38] führten 1932 dann die Agglutinationsreaktion mit Beta-hämolysierenden Streptokokken ein. Ihr Untersuchungsverfahren hat sich mit Modifikationen bis auf den heutigen Tag erhalten. Die Untersuchungen erstreckten sich auf die Verwendbarkeit an anderen Streptkokkengruppen (B, C, D, E, F und G). Nur die Streptokokken der Gruppe A waren brauchbar, mit anderen Gruppen kam es nicht zu eindeutig positiven Agglutinationen (Dawson und Olmstead [137]). Diesem Verfahren folgten mehrere Autoren, auch die meisten, die in

jüngster Zeit über dieses Thema publizierten, bis T h u l i n 1948 [138] eine auf anderer Grundlage beruhende Methode bekanntgab, die Agglutination mit autoklavierten Beta-hämolysierenden Streptokokken. Die Ergebnisse weichen von den mit nichtautoklavierten Streptokokken ab.

Demnach lassen sich drei Agglutinationsarten unterscheiden, von denen die erste für die Routineuntersuchungen aufgegeben wurde.

1. Agglutination mit vergrünenden Streptokokken
2. Agglutination mit lebenden Streptokokken (=L-Agglutination)
3. Agglutination mit autoklavierten Streptokokken (=O-Agglutination)

Die L-Agglutination:

Die Streptokokken-L-Agglutination ist eine serologisch unspezifische Reaktion zum Zwecke des indirekten Nachweises einer Erkrankung an rheumatoider Arthritis (Polyarthritis rheumatica primaria). Für diese Krankheit ist die Reaktion etwa im gleichen Sinne als "spezifisch" anzusehen wie die W e i l - F e l i x -Reaktion für die Diagnose verschiedener Rickettsiosen.

Der Terminus "L-Agglutination" wurde von W i n b l a d und E n d s t r ö m [139] eingeführt. Sie arbeiteten mit der K a l b a k'schen Technik [140], die ihrerseits eine Modifikation der Methode von D a w s o n , O l m s t e a d und B o o t s [38] darstellt. In Bestätigung und Ergänzung früherer Befunde kamen sie zu der Auffassung, daß diese Art der Reaktion nur mit Streptokokken durchführbar ist, die keiner Spontanagglutination unterliegen und die keine Kapseln besitzen (s. a. unter O-Agglutination). In Kulturen, die über 14 Stunden alt sind, verschwände das für die Agglutination verantwortliche Antigen, wenn geschüttelt oder zentrifugiert wird (von K a l b a k [141] beobachtet). Dieses Verhalten legte die Vermutung nahe, daß es sich um ein "Oberflächenantigen" (Surface-antigen) handeln könnte. Da es sich nur in lebenden Streptokokkenkulturen findet, ist auch die Bezeichnung "Lebendantigen" vertretbar. Die Autoren entschlossen sich zu dieser letzteren Benennung, da die Abkürzung "L-Antigen", "L-Agglutination" auch für andere Sprachen (deutsch, schwedisch, holländisch usw.) brauchbar ist.

Die für die L-Agglutination benutzten Streptokokkenstämme gehören der Gruppe A an. Ein Stamm hat sich eingeführt, der Stamm SF 130 (Gruppe A, Typ 1). Dies ist ein alter Laboratoriumsstamm von Griffith, der von einem Scharlachkranken isoliert wurde und - um das nebenher anzuführen - ein schlechter SL-Bildner ist. Seine MHD beträgt 2,0 ml (Todd [142]). Es können aber ebensogut auch die Stämme anderer Typen Verwendung finden (Kalbak [140]), wie auch schon die Untersuchungen von Seifert und Tichy [101] beweisen, die mit Erfolg den für die SL-Produktion eingeführten Stamm S 84 (Typ 3) für die Agglutination ansetzten. Schmid, Portele, Ferstl und Rummelhardt [143] züchteten Beta-hämolysierende Stämme aus menschlichem Untersuchungsmaterial (Rachen-, Ohrabstriche, Wundabstriche usw.) und fanden sie teilweise als brauchbar. Eine serologische Differenzierung wurde nicht durchgeführt. Nach Kalbak [140] sind auch Streptokokken der Gruppe C und G für diese Verfahren zu verwenden.

Die O-Agglutination:

Die O-Agglutination wurde von Thulin angegeben [138]. Er wollte nicht nur ein Oberflächenantigen nachweisen, wie es das L-Antigen darstellt, sondern ein Körperantigen. In Anlehnung an das Antigenschema der Salmonellen und der Koligruppe von Kauffmann-White und von Vahlne bringt er ein Schema, welches den vermutlichen Antigenaufbau der Streptokokken veranschaulicht (Abbildung 1).

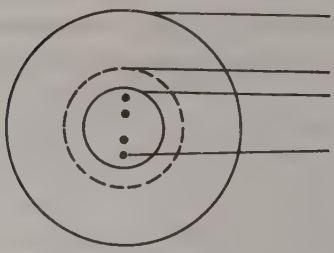


ABBILDUNG 1

Das Y-Antigen ist das für die L-Agglutination verantwortliche Antigen und läßt sich durch Züchtung in Bouillon gewinnen.

Das K-Antigen hemmt die O-Agglutination, ist wahrscheinlich typenspezifisch und kommt in virulenten Stämmen vor. Es läßt sich nach der Zerstörung der Kapsel mit Stierhodenhyaluronidase gewinnen.

Das O-Antigen, das somatische Antigen, ist für die O-Agglutination verantwortlich und läßt sich nach Autoklavierung der 16stündigen Bouillonkultur für 2 Stunden bei 120 Grad C gewinnen.

Die O-Antigene sind nach T h u l i n [144] teilweise mit der L a n c e f i e l d 'schen gruppenspezifischen Substanz C identisch. Absorptionsversuche ad modum C a s t e l l a n i legten nahe, daß diese O-Antigene aus verschiedenen Partialantigenen zusammengesetzt sind, die T h u l i n mit lateinischen Ziffern bezeichnete. So kommt z.B. das Partialantigen I in A-Stämmen, das Partialantigen V in C, III in einigen D- und XI in einigen L-Stämmen vor. Mit seinem Agglutinationsverfahren wollte T h u l i n die entsprechenden Antikörper bei Streptokokkeninfektionen nachweisen. Das O-Antigen soll, wie T h u l i n [144] in einer späteren Arbeit mitteilt, aus der Substanz C (= gruppenspezifische Substanz) und einem Faktor R bestehen, der wahrscheinlich ein komplexes Antigen aus verschiedenen Nukleoproteinen ist. R o s e n d a l [145, 146, 147] hat sich dieser speziellen Frage angenommen. Nach ihren Untersuchungen ist das T h u l i n 'sche O-Antigen keine einheitliche Substanz. Die Erhitzung auf 120 Grad C zerstört nur das T-Antigen. Die C-Substanz bleibt erhalten (auch bei Erhitzung auf 127 Grad C) und daneben auch noch mehr oder weniger große Mengen der typenspezifischen Substanz M. Das allen A-Streptokokken gemeinsame Antigen von T h u l i n (=Partialantigen I) mag mit der gruppenspezifischen Substanz C identisch sein, wogegen die verbleibenden O-Partialantigene durch 120 Grad C Erhitzung unzerstört gebliebene M-Antigene sind. Es ist vorerst nicht geklärt, ob die T h u l i n 'sche R-Komponente mit den Partialantigenen identisch ist, vielleicht entspricht sie, da sie aus Nukleoproteinen besteht, der unspezifischen Substanz P.

Da es sich bei der O-Agglutination um die Erfassung von somatischen Antigenen handelt, fallen die damit erhaltenen Ergebnisse anders aus.

Nicht nur chronische Polyarthritiden rufen positive Reaktionen hervor, sondern auch die sicher streptokokkenbedingten Infektionen (rheumatisches Fieber, Scharlach, Glomerulonephritis usw.).

Technik beider Reaktionen:

a) Die L-Agglutination:

Für eine einwandfreie Agglutination ist die Wahl des Peptons sehr wichtig. Geeignet ist Bacto-oder Orthanapepton. Wittepepton ist zwar brauchbar, gibt aber nicht so einwandfreie Ergebnisse wie die Verwendung der beiden erst genannten Peptonpräparate.

Streptokokkenstamm: Meist benutzt man den Streptokokkenstamm SF 130 (Gruppe A, Typ 1).

Nährmedium: Zu 750 g zerkleinertem Rindfleisch wird 1500 ml Leitungswasser gegeben und über Nacht im Kühlschrank bei 4 Grad C aufbewahrt. Am nächsten Tag wird 15 Minuten gekocht, durch Papier gefiltert, mit 5 n NaOH auf pH 8,0 eingestellt und erneut 30 Minuten gekocht. Zu je 500 ml der Bouillon gibt man 5,0 g Pepton (s.o.) und 2,5 g NaCl, worauf erneut bis zur Lösung aufgekocht wird. Der pH wird nochmals mittels 5 n NaOH auf 8,0 eingestellt, in Kolben abgefüllt und für 20 Minuten bei 120 Grad C autoklaviert. Der pH sinkt dann auf etwa 7,6 - 7,8 ab (nach K a l b a k [148]).

Beimpfung: Von einer etwa 10ständigen Vorkultur ausgehend, wird die Bouillon beimpft (Menge je nach Anzahl der zu untersuchenden Seren) und 10 bis 14 Stunden bei 37 Grad C bebrütet. Die Bouillon soll nur schwach getrübt sein. Bei starkem Wachstum tritt meist Spontanagglutination ein.

Ansatz des Testes: Das Patientenserum wird mit 0,3%iger NaCl-Lösung verdünnt und in 7 Röhrchen in der Verdünnung 1:10 bis 1:640 in 0,5 ml Mengen angesetzt. Dazu kommt die gleiche Menge des Antigens (unverdünnte Bouillonkultur). Nach Aufsetzen eines

Gummistopfens wird 2 Stunden im Wasserbad bei 52 Grad C bebrütet. Über Nacht kommen die Röhrchen in den Kühlschrank und werden danach erst abgelesen.

Ablesung: Die Ablesung erfolgt in 5 Stufen:

0 = keine Agglutination
1 = leichte Agglutination. Nach Aufschütteln diffuse Trübung.
2 = mittelgroße Partikel, überstehende Flüssigkeit klar.
3 = große Partikel, Flüssigkeit klar.
4 = Das Sediment besteht aus einem kaum zerschüttelbaren zusammenhängenden Bodensatz.

Die Stärke 1 gilt noch als negative Reaktion. Gelegentlich kommt es zum Prozonenphänomen [148, 149], also etwa mit folgendem Agglutinationsbild 0121000. Diese sog. "negative atypische Reaktion" fanden B ö n i und W i n b l a d [149] gar nicht so selten (36%) in den Seren von Tuberkulosekranken. Sie kommen aber auch bei anderen Serumproben vor.

Agglutination in der Verdünnung > 1:20 gilt als pathologisch erhöht. Da K a l b a k die zusätzliche Verdünnung des Serums durch die Streptokokkenbouillon mitrechnet, stimmen die Angaben W i n b l a d s und K a l b a k s überein.

b) Die O-Agglutination:

Der Ansatz des Testes erfolgt in gleicher Weise wie der der L-Agglutination. Das Antigen wird jedoch vorher abzentrifugiert, mehrere Male gewaschen (mit Phosphatpufferlösung pH 7,8) und dann 2 Stunden bei 127 Grad C autoklaviert. Die Antigenverdünnung wird auf etwa 10^9 Keime pro ml eingestellt. Der Ansatz erfolgt in 0,2 ml Mengen.

Die Agglutinationsnormaltiter:

Einen "Normaltiter" findet man bei den Streptokokkenagglutinationen nicht. Es gibt wohl auch unter gesunden Personen solche, die erhöhte Titer aufweisen, die teilweise noch unter der als pathologisch

anzusehenden Grenze liegen, doch weisen die Mehrzahl der untersuchten Seren in den üblichen Serumverdünnungen zum Test (ab 1:20) keine Agglutination auf. Zu der oberen Grenze der Norm muß deshalb der Prozentsatz gesunder Personen hinzugezählt werden, die die Norm überschreiten. Diese Grenzwerte sind auch wieder vom benutzten Stamm abhängig, worauf S e i f e r t und T i c h y [101] hinweisen. Man nimmt jetzt für die L-Agglutination im allgemeinen als niedrigsten "pathologischen" Titer eine Serumverdünnung von 1:20 an. Unter Zugrundelegung dieser Zahl fanden W i n b l a d und E d s t r ö m [139] 5,7% der untersuchten 80 Personen mit Titer > 1:20 (4 Personen 1:20, 2 Personen 1:40). K a l b a k [140] legte als niedrigsten pathologischen Grenzwert eine Verdünnung von 1:40 fest und fand damit unter 64 Blutspender 1,5% mit erhöhten Titern. Er untersuchte weitere Patienten mit verschiedenen nicht streptokokkenbedingten Erkrankungen und erhielt damit ähnliche Ergebnisse. Zur Bewertung des Ergebnisses als positiv oder negativ wird in den nordischen Ländern vielfach noch die Agglutinationsstärke in den verschiedenen Verdünnungen angeführt. Es scheint jedoch ratsamer, nur einen Grenztiter anzugeben.

Für die O-Agglutination nimmt man als niedrigsten pathologischen Titer eine stärkere Serumverdünnung als für die L-Agglutination an, nämlich 1:40. T h u l i n [138] fand damit im Sommerhalbjahr 3,2% erhöhte Titer, im Winter dagegen 11,6%, ein Zeichen dafür, daß die O-Agglutination auch auf Streptokokkeninfekte anspricht. G r a u d a l et al. [146] fanden bei Erwachsenen als häufigsten Titer eine Agglutination in einer Serumverdünnung 1:80. Sie sahen eine deutliche Abhängigkeit vom Alter der Untersuchten. Im Nabelschnurblut fanden sich sehr niedrige Titer, die innerhalb der nächsten 10 Lebensjahre ansteigen, wonach dann der Durchschnittstiter der Erwachsenen erreicht wird. Jenseits des 60. Lebensjahres wird ein signifikanter Titerabfall beobachtet. Die O-Agglutinine verhalten sich in dieser Beziehung gleichsinnig mit dem ASL. Höhere Werte, nämlich einen Durchschnittstiter von 1:160 bei 10 bis 15 Jahre alten Kindern im Staate Connecticut fanden Q u i n n , L i a o und Q u i n n [150]. Eine sehr hohe Festlegung des Titers fordert O e d i n g [151]. Er fand unter 200 "Normalpersonen" (Gesunde und Kranke ohne Streptokokkeninfektionen) nachstehende Titerverteilung:

Titer	< 1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280
Anzahl d. Unter-suchten (=200)	18	20	73	51	26	11	1
%	9	10	36,5	25,5	13	5,5	0,5

Bei Anwendung der T h u l i n 'schen Bewertung hätten demnach 91% der untersuchten Gesunden erhöhte Titer. Er schlägt deshalb die Festlegung des geringsten pathologischen Titers auf 1:640 vor und fordert ferner, daß jeder Untersucher zunächst seine eigenen Erfahrungen an einem "Normalmaterial" sammeln müsse, ehe er daran gehen könne, Krankenseren zu bewerten.

Gibt es verschiedene Rheumafaktoren [152]?

Seit der Entdeckung des Phänomens der Agglutinabilität sensibilisierter Schafblutkörperchen durch gewisse menschliche Seren von Meyer (1922) sind über viele Zwischenstationen serologische Verfahren entwickelt worden, die mit den Namen Waaler, Rose, Heller, Svartz und Schlossmann, Singer und Plotz, Cecil, Nicholls und Stainsby usw. eng verknüpft sind und die Erkennung des primär chronischen Rheumatismus aus dem Serum zum Ziele haben. Durch die Auffindung des sogenannten Rheumatoiden Arthritisfaktors (RF) und seine Isolierung sowie die Sicherstellung seiner Lokalisation im Serum-Globulin-Bereich mittels der verschiedensten Methoden ist die Aufklärungsarbeit des RF weiter gediehen und eine Fülle neuer Nachweisverfahren auf den Plan getreten, mit dem Latex-Fixations-Test an der Spitze. Gerade dieses letztere Testverfahren wurde für Seifert und Tichy [152] erneut zum Urheber des Zweifels, daß das, was man allgemein als RF bezeichnet, kein einheitliches Gebilde zu sein scheint und der Latex-Fixations-Test gar keine so engen Beziehungen zu dem RF haben kann, wie ihm größtenteils zugesprochen wird, obwohl in den Einleitungen von ungezählten Veröffentlichungen über den Latextest stets und stereotyp vom Nachweis des RF die Rede ist. Seifert und Tichy [152] haben auch diesen Worten anfangs Glauben geschenkt, bis sie an deren bedingungsloser Richtigkeit zweifelten und in gar nicht so seltenen Fällen feststellen mußten, daß es Seren mit hohem Waaler-Rose- und negativem Latex-Titer gibt und umgekehrt. Seifert [153] hat 1961 seine Zweifel hierüber schon an Absorptionsversuchen zum Ausdruck gebracht mit der Einschränkung, daß das Gamma-Globulin bei Absorptionsfähigkeit und Titerhöhe ausübt. Auch kann die Mitteilung von Seifert [154, 155], wonach dem Streptokokken agglutinierenden Faktor eine Latextiterbildung zukommt, durch die neuesten Untersuchungen als überholt angesehen werden. Nach der letzten in diese Richtung weisenden Arbeit von Seifert [156] ist der primär chronische Rheumatismus durch das Auftreten von

4 voneinander unterschiedlichen Serumfaktoren charakterisiert. Von einem 5. Faktor, dem wahrscheinlich eine Hemmfunktion zukommt, soll an dieser Stelle nur andeutungsweise gesprochen werden.

Hier befaßt sich mit der Isolierung dieser 4 Faktoren aus dem Rheumatikerserum, der Herstellung der jeweiligen Antiseren und einem Präzipitationsverfahren, mit dessen Hilfe die Spezifität der Faktoren bewiesen werden kann. In Anlehnung an die Ergebnisse der diffizilen in-vitro-Untersuchungen vermeidet S e i f e r t aus ganz bestimmten Gründen den bisher gebräuchlichen Terminus "Rheumatischer Arthritisfaktor". S e i f e r t und T i c h y [152] richten ihre neue Begriffsbestimmung nach der spezifischen Leistung, d.h. der Befähigung der Faktoren, mit sensibilisierten Schafblutkörperchen (W a a l e r - R o s e -Reaktion), Streptokokken (L-Agglutinations-Reaktion) und Latexpartikeln (Latex-Fixations-Test) in Reaktion zu treten, d.h. diese korpuskulären Elemente aus ihrem Zustand der Homogenität in den der Agglutination oder Präzipitation zu überführen. Sie bezeichnen also in Zukunft die einzelnen in der Hauptsache bei Kollagenkrankheiten sowie auch die bei primär chronischem Rheumatismus auftretenden Faktoren nicht mehr nach ihrer Krankheitsherkunft, weil das irreführend ist, insofern diese nicht einmal an den kollagenen Formenkreis gebunden sind, sondern darüber hinaus noch beim Gesunden vorkommen können. Daß es sich bei den im Verlauf dieser Arbeit noch genauer zu besprechenden Substraten nicht um einen solitär auftretenden Rheumafaktor schlechthin handelt, sondern um ein aus mehreren Einzelkomponenten bestehendes Konglomerat mit jeweils in Gruppen zu zweien auftretenden Faktoren, die untereinander keine immunologische Verwandtschaft erkennen lassen, wird an Hand zahlreicher Versuche bewiesen [152].

Dies ist auch der alleinige Grund für die Namensgebung der 4 Faktoren nach ihren in-vitro-Immunleistungen. S e i f e r t und T i c h y [152], unterscheiden demnach zwischen einem hämagglutinierenden Faktor (HF), dem allein die Fähigkeit der Agglutination von sensibilisierten Schafblutkörperchen bei der W a a l e r - R o s e -Reaktion und der Gamma-Globulin-Reaktion zukommt, einem in 2 Teile zerfallenden Latexpartikel agglutinierenden Faktor (LF 1 und LF 2), der für die Zusammenballung der mit Gamma-Globulin vorbehandelten Latexteilchen verantwortlich ist, und einem Strepto-

kokken agglutinierenden Faktor (SF), der Beta-hämolysierende A-Streptokokken bei der L-Agglutination zusammenballt.

Nachstehend erfolgt eine Erläuterung des der Untersuchung zugrunde liegenden Prinzips und des technischen Vorgehens bei der Isolierung aller 4 Faktoren [152]. Wie aus den jüngsten Untersuchungen von S e i f e r t [156] zu ersehen ist, läßt sich aus Rheumatikerserum gemäß dem Vorgehen von S v a r t z [157] und S c h l o s s m a n n durch Einleiten von CO_2 in eisgekühltes Material ein Niederschlag gewinnen, der sich in 2 Komponenten spalten läßt und von S e i f e r t als kältepräzipitable Faktorengruppe (HF, LF 1) bezeichnet wird. Es ist der Hämagglutinierende Faktor (HF), der für sich isoliert, nur die W a a l e r - R o s e -Reaktion und die Gamma-Globulin-Reaktion zum positiven Ausfall bringt und zum anderen das von S e i f e r t als Latexpartikel agglutinierenden Faktor (LF 1) bezeichnete Substrat, das für einen positiven Latex-Fixations-Test verantwortlich zeichnet. Wird in dem überstehenden Serum durch Absorption mit sensibilisierten Schafblutkörperchen (Sch BK) noch ein sogenannter Hemmfaktor entfernt - über dessen Eigenschaften noch keine ausreichenden Kenntnisse vorhanden sind - und dann das nunmehr auf Zimmerwärme gebrachte Serum abermals mit CO_2 durchperlt, dann fällt ein weiterer Niederschlag als sogenannte wärmepräzipitable Faktorengruppe (LF 2, SF) aus, der einen zweiten Latexpartikel agglutinierenden Faktor (LF 2) enthält, welcher von LF 1 unterschiedlich ist, darüber hinaus aber noch einen Streptokokken agglutinierenden Faktor (SF), der die L-Agglutinations-Reaktion positiv werden läßt, indem er nur Beta-hämolysierende A-Streptokokken zusammenballt, alle anderen für die restlichen Reaktionen verwendeten korpuskulären Elemente dagegen nicht. Es handelt sich im wesentlichen dabei um 5 Faktoren - wenn man den vorläufig als Hemmfaktor bezeichneten Körper mitrechnen will - die im Rheumatikerserum auftreten und um deren Unterscheidungsmerkmale es hier im wesentlichen geht. Normalseren enthalten diese 5 Faktoren nicht.

In den nachfolgenden 6 Abschnitten erfolgt eine genauere Beschreibung der Absorptions- und Fällungstechnik, die für die Isolierung der 4 Faktoren von entscheidender Bedeutung ist [152]

1. Absorption der Heterohämagglutinine. Die Entfernung der bei Rose-titer oft erhöhten unspezifischen Heterohämagglutinine erfolgt durch Absorption mit normalen, unvorbehandelten Sch EK. Technisch geht das so vor sich, daß zu 1 ml inaktiviertem Patientenserum 0,1 ml 4 mal mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschenes Sch BK-Sediment hinzugefügt wird und für 1 Stunde bei 37 Grad C verbleibt. Danach wird 3 Minuten bei 4000 U/Min. zentrifugiert und das überstehende unverdünnte Serum abgehebert; dieses enthält unvermindert alle 5 Faktoren.

2. Absorption des hämagglutinierenden Faktors (HF). Hierzu und zu allen Versuchen benutzen S e i f e r t und T i c h y [152] grundsätzlich nur von Heterohämagglutininen schon befreites Patientenserum: Im Prinzip werden zu dem Patientenserum sensibilisierte Sch BK hinzugefügt und diese nach der mit dem HF eingegangenen Bindung samt diesem aus dem Serum entfernt. Die Sensibilisierung erfolgt durch Zugabe von Anti-Sch BK-Kaninchenserum (Ambozeptor) in der üblichen und bekannten Weise, nur mit dem Unterschied, daß S e i f e r t und T i c h y die Sch BK mit der doppelten der sonst zur Ausführung der Rose-Reaktion üblichen Konzentration von Anti-Sch BK-Kaninchenserum sensibilisieren, wobei folgender Abschnitt als Richtschnur für ihr Vorgehen gilt.

Die Sensibilisierung richtet sich nach der Höhe des Hämolysetiters des Anti-Sch BK-Kaninchenserums. Im allgemeinen halten S e i f e r t und T i c h y folgende Erfahrungsregeln ein: Wird z.B. für die Rose-Reaktion zur Sensibilisierung der Sch BK ein Anti-Sch BK-Kaninchenserum vom Hämolysetiter 1:3200 benutzt, mit dem dann in der Verdünnung von etwa 1:10000 bis 1:12000 sensibilisiert wird, dann pflegen sie die Sch BK, die sie sensibilisiert zur Absorption des HF aus dem Patientenserum benutzen, mit der doppelten Konzentration an Anti-Sch BK-Kaninchenserum zu sensibilisieren.

Praktisch sieht das so aus, daß ein in physiologischer NaCl-Lösung suspendiertes 2%iges Sch BK-Sediment mit Anti-Sch BK-Kaninchenserum vom Hämolysetiter 1:3200 in der Verdünnung 1:6000 20 Minuten bei 37 Grad C und 1/2 Stunde bei Zimmertemperatur belassen wird. Diese Zeit genügt, um das richtige Quantum an Ambozeptor an die Erythrozytenoberfläche zu fixieren.

Der Sensibilisierung der Sch BK folgt nun die Absorption des Serums. Zu diesem Zweck wird zu 1 ml inaktiviertem und von Heterohämagglutininen befreiten Serum 1 ml eines 2%igen Sedimentes sensibilisierter Sch BK hinzugefügt und nach einstündigem Bruträumaufenthalt bei 37 Grad C 4 Minuten bei 4000 Umdrehungen je Minute zentrifugiert. Die überstehende, vom HF befreite, Flüssigkeit enthält noch den SF, LF 1 und LF 2.

Die Absorption des HF kann in gleicher Weise mit tannierten und Human-Gamma-Globulin beladenen Sch BK erfolgen wie sie für die Gamma-Globulin-Reaktion verwendet werden.

3. Absorption der Latexpartikel agglutinierenden Faktoren (LF 1 und LF 2). Die Absorption erfolgt mit Polystyrol-EF-Latex, der mit Gamma-Globulin beladen und in Boratpufferlösung suspendiert wird. Zur Erreichung einer völligen Eliminierung des LF 1 bzw. des LF 2 aus dem Patientenserum haben S e i f e r t und T i c h y [152] das Latexmaterial gegenüber dem zur Latex-Fixations-Test verwendeten in der Konzentration verzehnfacht. In dem ersten Arbeitsgang werden zu 1,56 ml Gamma-Globulin 3,44 ml Boratpufferlösung gegeben. Dann fügt man zu 5 ml Boratpufferlösung 1 ml einer 1:10 verdünnten frisch filtrierten Latexverdünnung. Schließlich werden je 5 ml der Gamma-Globulin-Boratpufferlösung mit der Latex Boratpufferlösung zusammengefügt und diese 10 ml der doppelten Menge Serum für 2 Stunden bei 37 Grad C hinzugegeben. Abschließend wird 1 Stunde bei 4000 Umdrehungen je Minute zentrifugiert, wobei der Latex-Fixations-Test in dem überstehenden Serum negativ werden muß.

4. Absorption des Streptokokken agglutinierenden Faktors (SF). Auch hierzu benutzen S e i f e r t und T i c h y nur heterohämagglutininfreies Serum. Die Absorption mit Streptokokken setzt die Verwendung frisch gewachsener Keime voraus, die unter folgenden Bedingungen gewonnen werden: Frische Rinderherzbouillon, wie sie zur O-Streptolysinherstellung für die Antistreptolysinreaktion benutzt wird, beimpft man mit einer Subkultur des Kalback'schen Beta-hämolysierenden A-Streptokokkenstammes S 84, Typ 3. Nach 16stündigem Wachstum bei 37 Grad C wird das Streptokokkensediment zweimal mit physiologischer NaCl-Lösung

gewaschen, um noch anhaltende Reste von O-Streptolysin zu entfernen. Nun beginnt der eigentliche Vorgang der Absorption.

Hierzu werden zu 1 ml heterohämagglutinin freiem Serum 0,1 ml Streptokokkensediment hinzugefügt, bis sich die Absorption nach 2 Stunden bei 37 Grad C vollzogen hat. Das nach der Zentrifugation gewonnene überstehende unverdünnte und von SF befreite Serum enthält noch den HF, LF 1 und LF 2. Sollten die Absorptionen den notwendigen Reinheitsgrad des Serums noch nicht hervorgerufen haben, ist die Absorptionszeit zu verlängern oder das Absorbens zu konzentrieren.

5. Die CO_2-Einleitung kann auf zweifache Weise erfolgen. Einmal stehen die sogenannten CO_2-Bomben als Gasflaschen zur Verfügung und zum anderen im Handel erhältliches Trocken-CO_2 als Kohlensäureschnee, der sich mehrere Tage lang in einem Dewargefäß aufbewahren läßt. Beide CO_2-Quellen haben sich S e i f e r t und T i c h y bestens bewährt, wobei sie bei einem großen Untersuchungsanfall dem Trocken-CO_2 den Vorzug geben, während die CO_2-Gasflasche bei seltener auftretenden Arbeiten ihren Zweck hinreichend gut erfüllt. In jedem Falle erfolgt die Einleitung des CO_2 in das das Serum enthaltende Reagenzglas vermittels eines dünnen Gummischlauches oder einer Glaskapillare, wobei ein zu schnelles Einströmen des Gases wegen der dann einsetzenden intensiven Schaumbildung zu verhindern ist. Um einem dadurch bedingten Serumverlust vorzubeugen, ist es ratsam, dem Reagensglas den oberen Teil eines Trichters aufzusetzen und beide in der offenen Flamme miteinander zu verschmelzen.

Während die CO_2-Regulierung bei der Verwendung der Gasflasche durch den Ventilhahn erfolgt, ist es bei Benutzung von Trocken-CO_2 schwieriger. Für gewöhnlich verbringt man den CO_2-Schnee in ein Reagenzglas, das mit einem druchbrochenen Stopfen versehen ist, indem wiederum ein Glasrohr steckt. An diesem befindet sich ein Gummischlauch, der zu dem jeweiligen Serum enthaltenden Reagenzglas führt. Um ein zu schnelles Verdampfen des CO_2-Schnees zu verhüten - was durch die zimmerwarme Umgebungstemperatur begünstigt wird - verbringt man das CO_2-Schnee enthaltende Reagenzglas in ein mit CO_2-Schnee gefülltes Thermos-

gefäß (Dewargefäß). Ist die Gasbildung zu träge, wird das mit CO_2-Schnee gefüllte Reagenzglas aus dem ebenfalls mit CO_2-Schnee angefüllten Dewargefäß etwas herausgezogen, im gegenteiligen Falle tiefer hineingesteckt.

Die Durchleitung von CO_2 erfolgt einmal durch zimmerwarmes und zum anderen durch eisgekühltes Serum. S e i f e r t und T i c h y [152] bereiten letzteres, indem sie das Reagenzglas mit fein zerkleinerten Eisstückchen umhüllen und die Einleitung von CO_2 erst dann beginnen, wenn das Serum Temperaturen um den Nullpunkt angenommen hat. Zum vollständigen Ausfall des HF und LF 1 in eisgekühltem Serum kann ein 30 Minuten andauerndes Durchleiten von CO_2 schon ausreichend sein, während für die Fällung des LF 2 und SF bei zimmerwarmen Material eine längere Zeit erforderlich ist. Doch ist im allgemeinen 1 Stunde ausreichend, um auch die letzten präzipitablen Reste zur Ausfällung zu bringen. Läßt man das CO_2 kräftig durchperlen, was wegen der überschießenden Schaumbildung zu widerraten ist, kann die Durchströmungsdauer verkürzt werden.

6. Eine Auflösung der 4 Faktoren im menschlichen Serum ist überdies wegen des durch die CO_2-Einleitung bedingten pH-Abfalles nicht immer möglich. Erst die Zugabe von n/100 NaOH bis zum pH 8,0 führt zu seiner Wiederauflösung im Serum. Praktisch sieht das so aus, daß sich der Faktorenausfällung die Zentrifugierung anschließt. Dann wird die überstehende Flüssigkeit abgekippt und dem feinen Niederschlag 1 Tropfen n/100 NaOH hinzugefügt. Nach kurzem Schütteln wird dieser dem negativen Serum unter 2 Minuten langem Schütteln zugegeben, wonach sich die Faktoren völlig lösen.

Alle 4 isolierten Faktoren haben antigene Gefähigung. Durch die aktive Immunisierung mit den 4Faktoren lassen sich an Kaninchen spezifische Seren herstellen, die jeweils mit den 4 Faktoren antigene Präzipitationen ergeben [152]. Überkonzentrationen treten dabei nicht auf. Damit konnte die Unterschiedlichkeit der beiden Latex-agglutinierenden Faktoren LF 1 und LF 2 sichergestellt werden.

Die Bezeichnung Rheumatischer Arthritis Faktor wird nicht mehr beibehalten. Die Namensgebung der 4 Faktoren erfolgte nicht in An-

lehnung an die ihnen zugrunde liegende Krankheitsgruppe, sondern lediglich nach ihren spezifischen agglutinatorischen Leistungen gegenüber Schafblutkörperchen, Streptokokken und Latexpartikeln. Den Latex-Fixations-Test als Nachweisverfahren für den ehemals klassischen Rheumatischen Arthritis Faktor anzusehen, ist nach den Ergebnissen von S e i f e r t und T i c h y [152] und den bisherigen Resultaten der noch im Fluß befindlichen Arbeiten nicht anzunehmen, da er andere Faktoren nachweist als die 3 übrigen Agglutinationsreaktionen. Die Präzipitationen mit den 4 Antiseren sind spezifischer als die unspezifischen Agglutinationsreaktionen (Waaler-Rose-Reaktion, Gamma-Globulin-Reaktion, Latex-Fixations-Test, L-Agglutinations-Reaktion).

Literaturverzeichnis

1) Müller-Eberhard, H.J.: Dtsch. med. Wschr. 15, 719 (1959)
2) Cecil, R.L., Nicholls, E.E., Stainsby, W.J.: Amer. J. med. Sci. 181, 12 (1931)
3) Waaler, E.: Acta path. microbiol. scand. 17, 172 (1940)
4) Waller, M.V. u. Vaughan, J.H.: Proc. Soc. Exp. Biol. 92, 198 (1956)
5) Singer, J.M. u. Plotz, C.M.: Amer. J. med. 21, 888 (1956)
6) Epstein, W., Johnson, A. u. Ragan, C.: Proc. Soc. Exp. Biol. 91, 235 (1956)
7) Franklin, E.C., Holmann, H.R. u. Müller-Eberhard, H.J.: J. exp. med. 105, 425 (1957)
8) Heller, G., Kolodny, M.H., Lepow, H., Jacobson, A.S., Rivera, M.E. u. Marks, G.H.: J. Immunol. 74, 340 (1955)
9) Lamont-Havers, R.W.: Proc. Soc. exp. Biol. 88, 35 (1955)
10) Svartz, N. u. Schlossmann, K.: Ann. rheum. Dis. 14, 191 (1955)
11) Franklin, E.C., Kunkel, H.G., Müller-Eberhard, H.J. u. Holman, H.R.: Ann. rheum. Dis. 16, 315 (1957)
12) Kunkel, H.G., Franklin, E.C., Müller-Eberhard, H.J.: Dtsch. med. Wschr. 15, 720 (1959)
13) Ziff, M.: J. chron. Dis. 5, 644 (1957)
14) Müller-Eberhard, H.J. u. Kunkel, H.G.: J. exp. med. 104, 253 (1956)
15) Wallenius, G.R., Trautmann, R., Kunkel, H.G. u. Franklin, E.C.: J. biol. Chem. 225, 254 (1957)
16) Müller-Eberhard, H.J., Kunkel, H.G. u. Franklin, E.C.: Proc. Soc. exp. Biol. 93, 146 (1956)
17) Franklin, E.C. u. Kunkel, H.G.: J. Immunol. 78, 11 (1957)
18) Fudenberg, H.H. u. Kunkel, H.G.: J. exp. med. 106, 689 (1957)
19) Gordon, R.S.: J. Immunol. 71, 220 (1953)
20) Müller-Eberhrad, H.J., Kunkel, H.G. u. Franklin, E.C.: Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 63, 642 (1957)
21) Müller-Eberhard, H.J., Franklin, E.C. u. Kunkel, H.G.: Dtsch. med. Wschr. 15, 721 (1959)
22) Braunsteiner, H., Egghart, F., Puxkandl, H., Reinhardt, F. u. Wiedermann, G.: Wien. Zschr. inn. Med. 39, 97 (1958)
23) Ziff, M. und Mitarb.: Amer. J. Med. 20, 500 (1956)
24) Svartz, N. u. Schlossmann, K.: Ann. rheum. Dis. 16, 73 (1957)

25) Vaughan, J.H.: J. Immunol. 77, 181 (1957)
26) Müller-Eberhard, H.J.: Dtsch. med. Wschr. 15, 722 (1959)
27) Edeman, G.M., Kunkel, H.G. u. Franklin, E.C.: J. exp. Med. 108,105 (1958)
28) Najjar, V. u. Fischer, J.: Biochim. Biophys. Acta 20, 158 (1956)
29) Kunkel, H.G.: Arthritis and Rheumatism 1, 381 (1958)
30) Eyquem, A.: zit. Müller-Eberhard, H.J.: Dtsch. med. Wschr. 15, 723 (1959)
31) Steffen, C.: Wien. Zschr. inn. Med. 35, 422 (1954)
32) Egghart, F., Wiedermann, G. u. Braunsteiner, H.: Wien. Zschr. inn. Med. 39, 447 (1958)
33) Meyer, K.: Zschr. Immunit.-Forsch. 34, 229 (1922)
34) Olsen, O.: Zschr. Immunit.-Forsch. 33, 183 (1922)
35) Rose, H.W., Ragan, C., Pearce, E. u. Lipman, M.O.: Proc. Soc. exp. Biol. Med. 68, 1 (1948)
36) Heller, G. und Mitarb.: Proc. Soc. exp. Biol. Med.: N.Y. 72, 316 (199)
37) Heller, G., Jacobson, A.S., Kolodny, M.H. u. Schuman, R.L.: J. Immunol. 69, 27 (1952)
38) Dawson, M.H., Olmstead, H. u. Boots, R.H.: J. Immunol. 23, 187 (1932)
39) Heller, G. u. Mitarb.: J. Immunol. 72, 66 (1954)
40) Egghart, F., Wiedermann, G. u. Braunsteiner, H.: Wien. Zschr. inn. Med. 39, 450 (1958)
41) Zavázal, V.: Zschr. Rheumaforsch. 17, 41 (1958)
42) Rheins, M.S. u. Mitarb.: Ann. Rheumat. Dis. 96, 67 (1957)
43) Tanner, M. u. Ziff, M.: Arthritis and Rheumatism 1, 376 (1958)
44) Singer, J.M. u. Plotz, C.M.: Arthritis and Rheumatism 1, 142 (1958)
45) Singer, J.M. u. Plotz, C.M.: J. Amer. Med. Ass. 180 (1958)
46) Feldmann, H. u. Mitarb.: Arch. int. Med. 101, 425 (1958)
47) Epstein, W. u. Mitarb.: Ann. Rheumat. Dis. 15, 385 (1957)
48) Mathies, H.: Med. Klin. 55, 2028 (1960)
49) Epstein, W. u. Mitarb.: Ann. Rheumat. Dis. 16, 448 (1957)
50) Egghart, F. u. Wiedermann, G.: Wien. Med. Wschr. 18, 384 (1959)
51) Kleine, N., Müller, W. u. Matthes, H.: Zschr. Rheumaforsch. 17, 206 (1958)
52) Müller, W. u. Schupp, E.: Zschr. Rheumaforsch. 18, 378 (1959)
53) Svartz, N. u. Schlossmann, K.: Acta med. Scand. 149, 83 (1954)
54) Wiedermann, G., Egghart, F. u. Braunsteiner, H.: Zschr. Rheumaforsch. 16, 314 (1958)
55) Olsen, C.R. u. Rantz, L.A.: Arthritis and Rheumatism 1, 54 (1958)

56) Wiedermann, G., Egghart, F. u. Braunsteiner, H.: Zschr. Rheumaforsch. 17, 314 (1958)
57) Brine, K.L., Wedyward, R.J. u. Clark, W.S.: Arthritis and Rheumatism 1, 230 (1958)
58) Bozicevich, J., Bunim, J.J., Freund, J. u. Ward, S.B.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 43, 635 (1957)
59) Heimer, R., Federico, O. u. Freyberg, R.: Arthritis and Rheumatism 1, 62 (1958)
60) Bozicevich, J., Bunim, J.J., Freund, J. u. Ward, S.B.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 97, 180 (1958)
61) Vaughan, J.H.: Arthritis and Rheumatism 1, 99 (1958)
62) Craig, H.W., Kerby, G.P. u. Persons, E.L.: J. Labor. Clin. Med. 49, 635 (1957)
63) Grubb, R.: Acta path. microbiol. Scand. 39, 195 (1956)
64) Miehlke, K. u. Puttnims, T.: Zschr. Rheumaforsch. 18, 372 (1959)
65) Miehlke, K.: Zschr. Rheumaforsch. 17, 362 (1958)
66) Waaler, E.: Acta Path. Microbiol. Scand. 17, 172 (1940)
67) Svartz, N.: Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 65, 147 (1959)
68) Ziff, M.: zit. Svartz, N. (93)
69) Jawetz, E. u. Hook, E.V.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 70, 650 (1949)
70) Whillans und Fishman: zit. Svartz, N. (93)
71) Heller, G., Jacobson, A.S. u. Kolodny, M.H.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 72, 316 (1949)
72) Hess, E.V.: Brit. Med. J. I, 1426 (1956)
73) Ball, J.: Lancet II, 520 (1950)
74) Svartz, N. u. Schlossmann, K.: Nord. Med. Tskr. 42, 1390 (1959)
75) Müller, W. u. Haffstein, E.: Zschr. klin. Med. 156, 154 (1959)
76) Landmann, B.: Ann. pediatr. fenn. 156 (1956)
77) Winblad, S.: Acta Med. Scand. 142, 458 (1951)
78) Losner, S. u. Volk, B.: Amer. J. Med. Sc. 229, 371 (1955)
79) Pike, R.M., Sulkin, S.E. u. Coggeshall, H.C.: J. Immunol. 63, 447 (1949)
80) Allison, A.C. u. Blumberg, A.S.: Arthritis and Rheumatism 1, 239 (1958)
81) Wager, O.: Ann. Med. Exper. Biol. Fenn. 28, 8 (1950)
82) Parrot, J.L. u. Mitarb.: Sem. hop. Paris 33, 2159 (1957)
83) Pike, R.M., Sulkin, S.E. u. Coggeshall, H.C.: Texas Rep. Biol. Med. 12, 138 (1954)
84) Boccarini, V., Gospodinoff, A.: Kongr. Zbl. inn. Med. 161, 383 (1955)

85) Svartz, N. u. Schlossmann, K.: Acta Med. Scand. 145, 216 (1953)
86) Köhler, W.: Dtsch. Ges. Wes. 12, 1221 (1957)
87) Köhler, W.: Beiträge zur Hygiene und Epidemiologie 9, 178 (1959)
88) Köhler, W.: Beiträge zur Hygiene und Epidemiologie 9, 88 (1959)
89) Bloch, K.J.: Bulletin on Rheumatic Diseases 8, 187 (1959)
90) Jacobson, A.S., Kammerer, W.H., Wolf, J., Epstein, W., Heller, G.: Amer. J. Med. 20, 490 (1956)
91) Hobson, D. u. Gorill, R.H.: Lancet II, 389 (1952)
92) Svartz, N: Ann. Rheum. Dis. 16, 441 (1957)
93) Svartz, N., Carlson, L.A., Schlossmann, K. u. Ehrenberg, A.: Acta Med. Scand. 160, 87 (1958)
94) Robinson, A.R., Stulberg, C.S. u. Kuyper, A.C.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 85, 4 (1954)
95) Swahn, B. u. Grubb, R.: Acta Path. Microb. Scand. 42, 173 (1958)
96) Foz, A.Y. u. Batalla, E.: Rev. Diagn. Biol. 3, 460 (1954)
97) Grubb, R.: Acta Rheum. Scand. 3, 55 (1957)
98) Greenbury, C.L.: Lancet II, 644 (1956)
99) Rothermich, N.O. u. Philips, V.K.: J. Amer. Med. Ass. 164, 1999 (1957)
100) Schmidt, H.: Fortschritte der Serologie. Darmstadt 1955
101) Seifert, H. u. Tichy, H.: Zschr. Rheumaforsch. 14, 133 (1954)
102) Dean, H.R.: Proc. Roy. Soc. London, Series B 84, 416 (1911)
103) Pike, R.M., Sulkin, S.E. u. Coggeshall, H.C.: J. Immunol. 66, 107 (1951)
104) Loghem-Langereis, P.E. van: Diss. Amsterdam 1950
105) Longcope, W.T.: J. clin. Invest. 15, 277 (1936)
106) Dickgiesser, F. u. Harter, F.: Zschr. ges. exp. Med. 122, 221 (1953)
107) Jacqueline, F., Eyquem, A. u. Podliachouk, L.: Rev. Rheumat. 24, 385 (1957)
108) Jacqueline, F., Podliachouk, L. u. Eyquem, A.: Rev. Franc. d'Etud. Clin. Biol. 1, 1092 (1956)
109) Gibson, H.J. u. Ling, N.R.: Ann. Rheumat. Dis. 15, 246 (1956)
110) Svartz, N.: Bull. Schweiz. Akad. Med. Wiss. 12, 99 (1956)
111) Gamp, A. u. Gillissen, G.: Zschr. Rheumaforsch. 12, 129 (1953)
112) Jacob, W. u. Roemer, G.B.: Zschr. Immunit. Forsch. 111, 32 (1954)
113) Alexander, R. u. de Forest, G.K.: Amer. J. Med. 16, 191 (1954)
114) Martin, J., Fleury (Mad.): Méd. et Labor. Nr. 57, 45 (1957)
115) Winblad, S.: Acta Med. Scand. 142, 450 (1952)
116) Frank, A. u. Schimanski, J.: Zschr. Rheumaforsch. 14, 238 (1955)

117) Daneo, V. u. Einaudi, G.: Ricerchi personali-Conclusioni. Min. Med. 45, Nr. 21 (1954)
118) Ball, J.: Ann. Rheum. Dis. 11, 97 (1952)
119) Miehlke, K. u. Schimanski, J.: Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 65, VII/33, (1959)
120) Bloch u. Bumin: J. A. M. A. 169, 307 (1959)
121) Henning: Laboratoriumsdiagnostik 2. Aufl. 1960
122) Rose, H.W., Ragan, C. u. Mitarb.: Proc. Soc. Exper. Biol. 71, 68 (1948)
123) Svartz, N. u. Schlossmann, K.: Acta Med. Scand. 142, 420 (1952)
124) Hartmann, F.: Zschr. Rheumaforsch. 16, 168 (1957)
125) Egghart, F., Wiedermann, G. u. Braunsteiner, H.: Wien. Zschr. inn. Med. 38, 364 (1957)
126) Miehlke, K., Kruppa, H.K. u. Schimanski, J.: Münch. med. Wschr. 8, 382 (1960)
127) Braunsteiner, H. u. Mitarb.: Dtsch. med. Wschr. 49, 2168 (1958)
128) Reinhardt, F., Egghart, F., Wiedermann, G. u. Braunsteiner, H.: im Druck
129) Miehlke, K., Kruppa, H.K. u. Schimanski, J.: Münch. med. Wschr. 8, 383 (1960)
130) Müller, W. u. Schupp, E.: Zschr. Rheumaforsch. Okt., 381 (1959)
131) Cecil, R.L., Nicholls, E.E., Stainsby, W.J.: Arch. Int. Med. 43, 571 (1929)
132) Cecil, R.L., Nicholls, E.E. u. Stainsby, W.J.: Proc. Amer. Ass. Path. Bact., Amer. J. Path. 6, 619 (1930)
133) Nicholls, E.E. u. Stainsby, W.J.: J. Clin. Invest. 10, 323 (1931)
134) Clawson, B.J., Wetherby, M., Hibert, E.H. u. Hilleboe, H.E.: Am. J. Med. Sci. 94, 758 (1932)
135) Gray, J.W. u. Gowen, C.H.: Amer. J. Med. Sci. 182, 682 (1931)
136) Nicholls, E.E. u. Stainsby, W.J.: J. Clin. Invest. 12, 505 (1933)
137) Dawson, M.H. u. Olmstead, M.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 34, 80 (1936)
138) Thulin, K.E.: Acta Path. Microbiol. Scand. 25, 264 (1948) und Dissertation Lund 1948
139) Winblad, S. u. Edström, G.: Acta Path. Microbiol. Scand. 25, 715 (1948)
140) Kalbak, K.: Ann. Rheum. Dis. 7, 230 (1947)
141) Kalbak, K.: Nord. Med. 31, 1997 (1946)
142) Todd, E.W.: J. Hyg. 39, 1 (1939)

143) Schmid, J., Portele, K., Ferstl, A. u. Kummelhardt, K.: Zschr. Rheumaforsch. 11, 286 (1952)
144) Thulin, K.E.: Acta Rheum. Scand. 1, 22 (1955)
145) Rosendal, K.: Acta Path. Microbiol. Scand. 38, 145 (1956)
146) Graudal, H., Rosendal, K., Weiss-Bentzon, M.: Acta Path. Microbiol. Scand. 38, 299 (1956)
147) Rosendal, K. u. Graudal, H.: Acta Path. Microbiol. Scand. 38, 164 (1956)
148) Kalbak, K.: Acta Med. Scand. 130, 358 (1948)
149) Böni, A. u. Winblad, S.: Acta Med. Scand. 132, 466 (1949)
150) Quin,, R. W., Liao, S.J. u. Quinn, J.P.: Amer. J. Gyh. 54, 331 (1951)
151) Oeding, P.: Nord. Med. 43, 374 (1950)
152) Seifert, H.: Zschr. ges. Inn. Med. 16, 1066 (1961)
153) Seifert, H.: Zschr. ges. Inn. Med. 16, 1067 (1961)
154) Seifert, H.: aus Tichy, H.: Beiträge zur Rheumatologie IV, Untersuchungen zur Laboratoriumsdiagnostik rheumatischer Krankheiten, VEB Verlag Volk und Gesundheit, 334, Berlin 1961
155) Seifert, H.: Zschr. Rheumaforsch. 20, 26 (1961)
156) Seifert, H.: Zschr. ges. Inn. Med. 1071 (1961)
157) Svartz, N. u. Schlossmann, K.: Schweiz. med. Wschr. 34, 782 (1953)
158) Mathies, H. u. Fürnrohr, S.: Klin. Wschr. im Druck
159) Vaughan, J.H., Broome, B.L. u. Howell, D.S.: Bull. rheum. Dis. 9, 185 (1959)
160) Svartz, N. u. Schlossmann, K.: Zschr. Rheumaforsch. 18, 150 (1959)

Ich danke Herrn Professor Dr. W. Seitz für die Überlassung des Themas; ebenso danke ich Herrn Dr. H. Mathies für die Anregungen und Ratschläge bei der Durchführung der Arbeit.

Am 8. Oktober 1936 wurde ich in Port-Said, Ägypten, als Sohn des Maschinenbau-Ingenieurs Mohamed Ali Moussa und seiner Ehefrau Nafisa geb. Saleh geboren.

Meine gesamte Schulzeit verbrachte ich in Port-Said. Nach drei Jahren Grundschule und 9 Klassen der Primary und Secondary School für Jungen, legte ich im Sommer 1954 die Reifeprüfung ab.

Das Studium der Medizin begann ich im Wintersemester 1954/55 an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München.

Im Wintersemester 1957/58 legte ich an der Münchner Universität die ärztliche Vorprüfung ab.

Am 13. Juni 1961 legte ich an der Münchner Universität die ärztliche Prüfung ab.